



ผลของสายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* และการหมักน้ำส้มสายชูโคจิข้าวแดงจากผลพลอยได้
พาสตาข้าวเจ้า

EFFECT OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* STRAINS AND FERMENTATION OF RED-
KOJI VINEGAR FROM RICE PASTA BY-PRODUCT

เสาวลักษณ์ จันทโรจน์

มหาวิทยาลัยบูรพา

2563

ผลของสายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* และการหมักน้ำส้มสายชูโคจิข้าวแดงจากผลพลอยได้
พาสตาข้าวเจ้า



เสาวลักษณ์ จันทโรจน์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

2563

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

EFFECT OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* STRAINS AND FERMENTATION OF RED-
KOJI VINEGAR FROM RICE PASTA BY-PRODUCT



SAOWALAK CHANTAROT


A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR MASTER OF SCIENCE
IN FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY
FACULTY OF SCIENCE
BURAPHA UNIVERSITY

2020

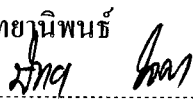
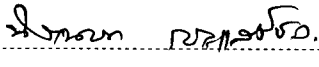

COPYRIGHT OF BURAPHA UNIVERSITY

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ได้พิจารณา
วิทยานิพนธ์ของ เสาวลักษณ์ จันทโรจน์ ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร ของมหาวิทยาลัย
บูรพาได้

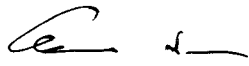
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์


..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สนิ จิระสถิตย์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พิทยา ใจคำ)

..... กรรมการ
(ดร. นิสานารถ กระแสร์ชล)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สนิ จิระสถิตย์)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร ของมหาวิทยาลัย
บูรพา


..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกรัฐ ศรีสุข)
วันที่ 19 เดือน สิงหาคม พ.ศ. 2563

59910222: สาขาวิชา: วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร; วท.ม. (วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร)

คำสำคัญ: น้ำส้มสายชูโคจิข้าวแดง, ไวน์โคจิข้าวแดง, ผลพลอยได้พาสตาข้าวเจ้า, *Saccharomyces cerevisiae*

เสาวลักษณ์ จันทโรจน์ : ผลของสายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* และการหมักน้ำส้มสายชูโคจิข้าวแดงจากผลพลอยได้พาสตาข้าวเจ้า. (EFFECT OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* STRAINS AND FERMENTATION OF RED-KOJI VINEGAR FROM RICE PASTA BY-PRODUCT) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ศนิ จิระสถิตย์ปี พ.ศ. 2563.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสายพันธุ์ยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5169, TISTR 5196 และ TISTR 5197) ต่อคุณภาพของไวน์โคจิข้าวแดงที่ผลิตจากผลพลอยได้พาสตาข้าวเจ้า และศึกษาคุณภาพของน้ำส้มสายชูโคจิข้าวแดงที่หมักด้วย *Acetobacter pasteurianus* TISTR 102 การทดลองนี้ทำการหมักโคจิผลพลอยได้พาสตาข้าวเจ้าด้วย *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นทำการหมักแอลกอฮอล์ด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน ผลการทดลองพบว่า ยีสต์ทุกสายพันธุ์เจริญเติบโต และผลิตแอลกอฮอล์ในระหว่างการหมัก โดย *S. cerevisiae* TISTR 5169 สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้สูง ในระยะเวลาสั้นกว่ายีสต์สายพันธุ์อื่น นอกจากนี้ไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย *S. cerevisiae* TISTR 5169 ยังมีคุณภาพทางด้านประสาทสัมผัสที่ดีกว่าตัวอย่างที่หมักด้วยยีสต์สายพันธุ์อื่น ดังนั้นไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย *S. cerevisiae* TISTR 5169 เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชูหมักเมื่อศึกษาคุณภาพของน้ำส้มสายชูโคจิข้าวแดง โดยนำไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักจาก *S. cerevisiae* TISTR 5169 มาทำการหมักกรดอะซิติกด้วย *A. pasteurianus* TISTR 102 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 39 วัน ผลการทดลองพบว่า *A. pasteurianus* สามารถเจริญ และออกซิไดซ์แอลกอฮอล์เพื่อผลิตกรดอะซิติกในระหว่างการหมัก โดยน้ำส้มสายชูโคจิข้าวแดงมีปริมาณกรดอะซิติกไม่น้อยกว่าร้อยละ 4 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เมื่อหมักเป็นเวลานาน 27 วัน นอกจากนี้ น้ำส้มสายชูโคจิข้าวแดงยังมีสมบัติเชิงหน้าที่ โดยมีปริมาณรงควัตถุสีเหลือง สีส้ม และสีแดง เท่ากับ 0.17, 0.08 และ 0.06 OD unit/g ตามลำดับ และมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณสารโมนาโคลิน เค ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส เท่ากับ 71.70 µg GAE/ml, 14.11 ไมโครกรัม ต่อ 100 กรัม ร้อยละ 58.75 และร้อยละ 71.70 ตามลำดับ และไม่พบสารพิษซิทรีนินในน้ำส้มสายชูโคจิข้าวแดง

59910222: MAJOR: FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY; M.Sc. (FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY)

KEYWORDS: red-koji vinegar, red-koji wine, rice pasta by-product, *Saccharomyces cerevisiae*

SAOWALAK CHANTAROT : EFFECT OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* STRAINS AND FERMENTATION OF RED-KOJI VINEGAR FROM RICE PASTA BY-PRODUCT. ADVISORY COMMITTEE: SANI JIRASATID, Ph.D. 2020.

The objective of this study was to investigate the effect of yeast strains (*Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5169, TISTR 5196 and TISTR 5197) on the quality of red-koji wines from rice pasta by-products. The quality of red-koji vinegar fermented with *Acetobacter pasteurianus* TISTR 102 was also investigated. Rice pasta by-product koji was cultivated by *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 for 4 days. In alcohol fermentation, rice pasta by-product koji was fermented by the different yeast strains at ambient temperature for 14 days. The results showed that all yeast strains grew and produced alcohol during fermentation. *S. cerevisiae* TISTR 5169 produced higher alcohol content in shorter fermentation time than that of the other yeast strains. In addition, red-koji wines fermented by *S. cerevisiae* TISTR 5169 found to have better sensory quality than samples fermented by other yeast strains. Therefore, *S. cerevisiae* TISTR 5169 red-koji wine was suitable for production of fermented vinegar. In acetous acid fermentation, red-koji wine fermented by *S. cerevisiae* TISTR 5169 was then fermented by *A. pasteurianus* TISTR 102 at ambient temperature for 39 days. It was found that *A. pasteurianus* grew and oxidized alcohol to acetic acid during fermentation. Red-koji vinegar contained no less than 4% (w/v) acetic acid after fermentation for 27 days. In addition, red-koji vinegar had functional properties. The yellow, orange and red pigment were 0.17, 0.08 and 0.06 OD unit/g, respectively. Total phenolic content, monacolin K, DPPH antioxidant activity and xanthine oxidase inhibitory activity were 71.70 µg GAE/ml, 14.11 µg/100g, 58.75% and 71.70%, respectively, and without citrinin toxin in red-koji vinegar.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศนิ จิระสถิตย์ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ที่กรุณาให้คำปรึกษา และข้อเสนอแนะตลอดการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ด้วยความละเอียดถี่ถ้วนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จเป็นรูปเล่มที่สมบูรณ์ นอกจากนี้ยังดูแลเอาใจใส่ และให้กำลังใจเสมอมา ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งใจเป็นอย่างยิ่ง จึงขอขอบคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณคณาจารย์ภาควิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาทุกท่าน ที่กรุณาให้คำแนะนำ และให้ข้อคิดเห็นอันเป็นประโยชน์กับงานวิจัยให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น จึงขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบคุณ บริษัท แฟมิลี่ ทรีส์ จำกัด ที่ช่วยสนับสนุนผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตพาสต้าข้าวเจ้า ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่ใช้ในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อสุทธิชัย และคุณแม่พิศวง ตลอดจนเพื่อน ๆ ที่ช่วยเหลือในการทำวิจัย คอยให้คำปรึกษา และเป็นกำลังใจให้ข้าพเจ้าด้วยดีเสมอมา จนสามารถทำสิ่งต่าง ๆ ให้สำเร็จ ล่วงได้ด้วยดี

คุณค่า และประโยชน์ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบเป็นกตัญญูกตเวทิตาแด่บุพการี บुरพาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่านทั้งในอดีต และปัจจุบันที่ทำให้ข้าพเจ้าเป็นผู้มีการศึกษา และประสบความสำเร็จมาจนตราบเท่าทุกวันนี้

เสาวลักษณ์ จันทโรจน์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ฉ
กิตติกรรมประกาศ.....	ช
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย	3
ขอบเขตของการวิจัย.....	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
น้ำส้มสายชู	5
ข้าว 8	
กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากข้าว.....	13
ข้าวแดง.....	36
พาสตา.....	43
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	48
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	50
จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา	50
วัตถุดิบ.....	50

อาหารที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อ.....	50
สารเคมีที่ใช้ทดสอบ	51
เครื่องมือ	51
อุปกรณ์อื่นๆ	52
วิธีดำเนินการทดลอง	52
บทที่ 4 ผลการทดลอง และวิจารณ์ผล	57
องค์ประกอบทางเคมีพื้นฐานของผลพลอยได้จากพาสตาข้าวเจ้า	57
ศึกษาสายพันธุ์ยีสต์ต่อคุณภาพของไวน์โคจิข้าวแดงที่ผลิตจากผลพลอยได้พาสตาข้าวเจ้า.....	57
ศึกษาคุณภาพของน้ำส้มสายชูโคจิข้าวแดงที่ผลิตจากผลพลอยได้พาสตาข้าวเจ้า.....	70
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ.....	79
สรุปผลการทดลอง	79
ข้อเสนอแนะ	80
บรรณานุกรม.....	81
ภาคผนวก	94
ประวัติย่อของผู้วิจัย	129

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2-1 องค์ประกอบทางเคมีพื้นฐานของเมล็ดข้าว.....	10
ตารางที่ 2-2 ตัวอย่างสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส และคุณสมบัติบางประการของ เอนไซม์ที่ผลิตได้.....	17
ตารางที่ 2-3 คุณสมบัติของแบคทีเรียสกุล <i>Acetobacter</i> และ <i>Gluconobacter</i>	29
ตารางที่ 2-4 สารเมแทบอลิต์ที่มีประโยชน์จากเชื้อรา <i>Monascus</i>	37
ตารางที่ 2-5 ขนาดของเซโมลินาที่ใช้ผลิตพาสตาในทางการค้า.....	46
ตารางที่ 4-1 องค์ประกอบทางเคมี และกายภาพของผลพลอยได้พาสตาข้าวเจ้า.....	57
ตารางที่ 4-2 จำนวนยีสต์ในไวน์โคจิจ้าวแดงที่หมักด้วย <i>Saccharomyces cerevisiae</i> TISTR 5169 (S5169), TISTR 5196 (S5196) และ TISTR 5197 (S5197).....	59
ตารางที่ 4-3 จำนวนราในไวน์โคจิจ้าวแดงที่หมักด้วย <i>Saccharomyces cerevisiae</i> TISTR 5169 (S5169), TISTR 5196 (S5196) และ TISTR 5197 (S5197).....	60
ตารางที่ 4-4 จำนวนรา และแบคทีเรียกรดอะซิติกในระหว่างการหมักน้ำส้มสายชูโคจิจ้าวแดงด้วย <i>Acetobacter pasteurianus</i> TISTR 102.....	75
ตารางที่ 4-5 คุณสมบัติเชิงหน้าที่ในตัวอย่างน้ำส้มสายชูโคจิจ้าวแดงที่หมักด้วย <i>Acetobacter</i> <i>pasteurianus</i> TISTR 102.....	77

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 2-1 ส่วนประกอบของเมล็ดข้าว.....	10
ภาพที่ 2-2 โครงสร้างของเมล็ดแป้ง.....	11
ภาพที่ 2-3 โครงสร้างของอะไมโลส.....	12
ภาพที่ 2-4 โครงสร้างของอะไมโลเพคติน.....	12
ภาพที่ 2-5 การทำงานของกลุ่มเอนไซม์อะไมเลส และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์แต่ละชนิด.....	16
ภาพที่ 2-6 กระบวนการชีวเคมีที่เซลล์เปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นเอทานอล.....	20
ภาพที่ 2-7 ลักษณะเซลล์ <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
ภาพที่ 2-8 กระบวนการชีวเคมีที่เซลล์เปลี่ยนเอทานอลเป็นกรดอะซิติก.....	26
ภาพที่ 2-9 ลักษณะของแบคทีเรียกรดอะซิติก.....	28
ภาพที่ 2-10 กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมัก.....	32
ภาพที่ 2-11 กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูกลั่น.....	33
ภาพที่ 2-12 Pasta Lunga หรือ Long Pasta เป็นเส้นที่มีความยาวเกิน 10 cm.....	44
ภาพที่ 2-13 Pasta Corta หรือ Short Pasta.....	45
ภาพที่ 2-14 หน้าแปลน (die) ของเครื่องเอกซ์ทรูเดอร์สำหรับการผลิตพาสตา.....	47
ภาพที่ 4-1 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย <i>Saccharomyces cerevisiae</i> TISTR 5169 (S5169), TISTR 5196 (S5196) และ TISTR 5197 (S5197).....	61
ภาพที่ 4-2 ปริมาณของแข็งที่สามารถละลายน้ำได้ทั้งหมดของไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย <i>Saccharomyces cerevisiae</i> TISTR 5169 (S5169), TISTR 5196 (S5196) และ TISTR 5197 (S5197).....	62
ภาพที่ 4-3 ปริมาณแอลกอฮอล์ของไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย <i>Saccharomyces cerevisiae</i> TISTR 5169 (S5169), TISTR 5196 (S5196) และ TISTR 5197 (S5197).....	63

สารบัญญภาพ (ต่อ)

หน้า

ภาพที่ 4-4 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย <i>Saccharomyces cerevisiae</i> TISTR 5169 (S5169), TISTR 5196 (S5196) และ TISTR 5197 (S5197).....	65
ภาพที่ 4-5 ปริมาณสารรงควัตถุสีเหลือง สีส้ม และสีแดงของไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย <i>Saccharomyces cerevisiae</i> TISTR 5169 (S5169), TISTR 5196 (S5196) และ TISTR 5197 (S5197).....	66
ภาพที่ 4-6 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย <i>Saccharomyces cerevisiae</i> TISTR 5169 (S5169), TISTR 5196 (S5196) และ TISTR 5197 (S5197).....	67
ภาพที่ 4-7 ภาพโครมาโทแกรมของสารมาตรฐานโมนาโคลิน เค ความเข้มข้น 2 ppm ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง.....	68
ภาพที่ 4-8 ภาพโครมาโทแกรมของไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย <i>Saccharomyces cerevisiae</i> TISTR 5197 (S5197) ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง.....	68
ภาพที่ 4-9 ปริมาณซิทรีนินของไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย <i>Saccharomyces cerevisiae</i> TISTR 5169 (S5169), TISTR 5196 (S5196) และ TISTR 5197 (S5197).....	69
ภาพที่ 4-10 คุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย <i>Saccharomyces cerevisiae</i> TISTR 5169 (S5169), TISTR 5196 (S5196) และ TISTR 5197 (S5197) ด้วยวิธี scoring test.....	70
ภาพที่ 4-11 ปริมาณกรดอะซิติก และปริมาณแอลกอฮอล์ของน้ำส้มสายชูโคจิข้าวแดงในระหว่างการหมักด้วย <i>Acetobacter pasteurianus</i> TISTR 102.....	72
ภาพที่ 4-12 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดของน้ำส้มสายชูโคจิข้าวแดงในระหว่างการหมักด้วย <i>Acetobacter pasteurianus</i> TISTR 102.....	73

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหา

น้ำส้มสายชูหมักเป็นเครื่องปรุงรสที่สำคัญที่มีการผลิตมานานหลายศตวรรษในหลายประเทศ เช่น จีน ญี่ปุ่น และสเปน เป็นต้น นอกจากน้ำส้มสายชูจะเป็นเครื่องปรุงที่สำคัญแล้ว น้ำส้มสายชูยังมีประโยชน์ต่อร่างกาย เนื่องจากน้ำส้มสายชูประกอบไปด้วยกรดอะซิติก และ สารประกอบโพลีฟีนอล ซึ่งน้ำส้มสายชูมีประโยชน์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ลดระดับน้ำตาลกลูโคสในกระแสโลหิต ลดความดันโลหิต ลดปริมาณคอเลสเตอรอลทั้งหมด ลดปริมาณไตรกลีเซอไรด์ ลดระดับไขมันที่มีความหนาแน่นต่ำ (low-density lipoprotein cholesterol, LDL) เพิ่มระดับไขมันที่มีความหนาแน่นสูง (high-density lipoprotein cholesterol, HDL) ช่วยในการลดน้ำหนัก ลดดัชนีมวลกาย มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และต้านโรคมะเร็ง (Chen, Chen, Giudici & Chen, 2016)

ทั้งนี้การผลิตน้ำส้มสายชูประกอบด้วยการหมัก 2 ขั้นตอน คือ ขั้นแรกเป็นการหมักน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ (alcohol fermentation) โดยยีสต์ ขั้นที่สองเป็นการออกซิไดซ์แอลกอฮอล์ให้เป็นกรดอะซิติก (acetification) โดยแบคทีเรียกรดอะซิติก อย่างไรก็ตามเมื่อวัตถุดิบที่ใช้ในการหมักเป็นธัญพืช และแป้งชนิดต่าง ๆ จะมีขั้นตอนการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล (saccharification) ด้วยเชื้อราก่อนทำการหมักแอลกอฮอล์ (Wang, Lee, & Pan, 2004) ทั้งนี้ในขั้นตอนการหมักน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์โดยยีสต์มีปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตแอลกอฮอล์ ได้แก่ สารอาหาร ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ออกซิเจน คาร์บอนไดออกไซด์ (สาวิตรี ลิ้มทอง, 2549) อุณหภูมิ ความชื้น (มะลิวัลย์ ชัยวสุวรรณ, 2556) และสายพันธุ์ของยีสต์ที่ใช้ในการหมัก (Puertas et al., 2018) ในขณะที่ขั้นตอนการออกซิไดซ์แอลกอฮอล์ให้เป็นกรดอะซิติก มีปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดน้ำส้มสายชู ได้แก่ ความเข้มข้นของกรดอะซิติก ความเข้มข้นของเอทานอล ออกซิเจน (Xia, Zhu, Yang, Xin, & Wang, 2015) ค่า pH อุณหภูมิ วิธีการหมัก (Ho, Lazim, Fazry, Zaki, & Lim, 2017) วัตถุดิบ และสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดอะซิติก (Chen, Zheng, Sun, Li, Lin & Li, 2015)

ทั้งนี้ น้ำส้มสายชูที่มีคุณภาพ และมีกลิ่นรสที่ดีได้มาจากไวน์ที่มีคุณภาพ และมีกลิ่นรสที่ดี ซึ่งจากงานวิจัยของ Satora, Semik-Szczurak, Tarko, and Bułdys (2018) ได้ทำการศึกษาอิทธิพลของสายพันธุ์ *Saccharomyces* และ *Schizosaccharomyces* และเชื้อผสมต่อองค์ประกอบทางเคมีของไวน์แอปเปิล พบว่า ยีสต์สายพันธุ์ต่าง ๆ สามารถผลิตเอทานอล และใช้น้ำตาลในปริมาณที่เท่ากัน

แต่สามารถผลิตกรดอินทรีย์ และสารระเหยในปริมาณที่แตกต่างกันซึ่งมีผลต่อคุณภาพของไวน์ ดังนั้นการคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ที่เหมาะสมในการหมักไวน์จึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง นอกจากนี้ Wongpiyachon, Youngsuk, and Sawangchit (2008) ได้ศึกษาการผลิตไวน์ข้าวจากเชื้อบริสุทธิ์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ต่าง ๆ จำนวน 10 สายพันธุ์ พบว่า ยีสต์แต่ละสายพันธุ์สามารถผลิตเอทานอลได้แตกต่างกัน และให้ไวน์ข้าวที่มีคุณภาพทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นรสที่ต่าง กัน โดยยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* TISTR 5169, TISTR 5196 และ TISTR 5197 สามารถผลิตเอทานอลในปริมาณที่สูง คือ ประมาณร้อยละ 12 เมื่อเทียบกับยีสต์สายพันธุ์อื่น ๆ ที่สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้ประมาณร้อยละ 9-11

ทั้งนี้วัตถุดิบที่นำมาใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชูมีหลายชนิด ได้แก่ ธัญพืช (ข้าวฟ่าง ข้าว หรือข้าวสาลี) ผัก และผลไม้ (องุ่นหรือแอปเปิล) หรือน้ำตาล (Chen et al., 2016) อย่างไรก็ตามยังไม่มีการใช้ผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมพาสตาข้าวเจ้าในการผลิตน้ำส้มสายชู ซึ่งผลพลอยได้พาสตาข้าวเจ้าเป็นผลพลอยได้ที่ได้จากกระบวนการแปรรูปด้วยเครื่องเอ็กซ์ทรูเดอร์เป็นเส้นพาสตาที่ไม่ได้ตามมาตรฐานนำมาอบแห้งแล้วบดให้ละเอียด ดังนั้นการประยุกต์ใช้ผลพลอยได้พาสตาข้าวเจ้าเป็นวัตถุดิบราคาถูกในการผลิตน้ำส้มสายชูจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ ซึ่งนอกจากเป็นการลดต้นทุนการผลิตแล้วยังเป็นการใช้ประโยชน์จากผลพลอยได้ และสามารถเพิ่มมูลค่าของผลพลอยได้

ข้าวแดง (Red yeast rice หรือ Red fermented rice หรือ Red-koji) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักข้าวกับเชื้อรา *Monascus purpureus* ข้าวแดงมีความสำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร โดยใช้เป็นสารให้สี และให้กลิ่นรสในอาหาร เช่น ปลา เนื้อ และเครื่องดื่มนั่นเอง เชื้อรา *M. purpureus* สามารถสร้างสารต่าง ๆ ที่มีประโยชน์ต่อร่างกายของมนุษย์ เช่น สารโมนาโคลิน เค (monacolin K) สารกาบา (Gamma amino butyric acid, GABA) และรงควัตถุ เป็นต้น สารโมนาโคลิน เค สามารถลดระดับคอเลสเตอรอลในกระแสเลือด ซึ่งได้รับการรับรองจากองค์การอาหาร และยาแห่งสหรัฐอเมริกา (United States Food and Drug Administration, USFDA) ถึงความมีประสิทธิภาพและความปลอดภัยในการลดระดับคอเลสเตอรอล โดยเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ HMG-CoA reductase ในวิถีการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลจากตับ (Suraiya et al., 2018) นอกจากนี้ยังพบรงควัตถุจากรา *Monascus* ทั้งหมด 6 ชนิด โดยแบ่งออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่ รงควัตถุสีแดง ประกอบด้วย rubropunctamine และ monascorubramine รงควัตถุสีส้มประกอบด้วย rubropunctatin และ monascorubrin และรงควัตถุสีเหลืองประกอบด้วย monascin และ ankaflavin (Pattanagul, Pinthong, Phianmongkhol, & Leksawasdi, 2007) ทั้งนี้รงควัตถุในกลุ่มสีเหลืองแสดงคุณสมบัติเชิงหน้าที่หลายประการ เช่น มีฤทธิ์ด้านการอักเสบ ต้านมะเร็ง ต้านอนุมูลอิสระ และมีฤทธิ์เป็นสารลด

ระดับไขมันในกระแสโลหิตโดยสามารถลดปริมาณคอเลสเตอรอลทั้ง ลดปริมาณไตรกลีเซอไรด์ และลดระดับไขมันที่ความหนาแน่นต่ำ (low-density lipoprotein cholesterol, LDL) ในกระแสเลือดของหนูแฮมสเตอร์ และยังเพิ่มระดับไขมันที่มีความหนาแน่นสูง (high-density lipoprotein cholesterol, HDL) (Jirasatid, Nopharatana, Kitsubun, Vichitsoonthonkul, & Tongta, 2013) อย่างไรก็ตามรา *Monascus* sp. สามารถผลิตสารซิทรินิน (citrinin) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารพิษที่มีผลต่อการทำงานของตับ และไตของมนุษย์ และสัตว์ (Patel, 2016) ดังนั้นสารซิทรินินจึงเป็นปัญหาสำคัญในการนำข้าวแดงมาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร องค์การสหภาพยุโรป (European Union, EU) กำหนดให้ผลิตภัณฑ์อาหารที่เติมข้าวแดงมีปริมาณซิทรินินไม่เกิน 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ล้านในล้านส่วน) (European, 2014) เช่นเดียวกับประเทศไต้หวันซึ่งกำหนดให้ผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพมีซิทรินินไม่เกิน 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (Jirasatid et al., 2013) ทั้งนี้จากประโยชน์ของข้าวแดง จึงเป็นที่น่าสนใจในการประยุกต์ใช้เป็นสารให้สี กลิ่นรส และเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการแก่ผลิตภัณฑ์น้ำส้มสายชูหมัก

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสายพันธุ์ยีสต์ต่อคุณภาพของไวน์โคจิข้าวแดงที่ผลิตจากผลพลอยได้พาสตาข้าวเจ้า และศึกษาคุณภาพของน้ำส้มสายชูโคจิข้าวแดงที่ผลิตจากผลพลอยได้พาสตาข้าวเจ้า

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของสายพันธุ์ยีสต์ต่อคุณภาพของไวน์โคจิข้าวแดงที่ผลิตจากผลพลอยได้พาสตาข้าวเจ้า
2. เพื่อศึกษาคุณภาพของน้ำส้มสายชูโคจิข้าวแดงที่ผลิตจากผลพลอยได้พาสตาข้าวเจ้า

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. ผลิตน้ำส้มสายชูโคจิข้าวแดงที่มีคุณภาพโดยใช้ผลพลอยได้พาสตาข้าวเจ้าเป็นวัตถุดิบ
2. เพิ่มมูลค่าของผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมพาสตา และลดต้นทุนในการผลิตน้ำส้มสายชูหมัก

ขอบเขตของการวิจัย

1. ศึกษาผลของสายพันธุ์ยีสต์ (*S. cerevisiae* TISTR 5169, *S. cerevisiae* TISTR 5196 และ *S. cerevisiae* TISTR 5197) ต่อคุณภาพไวน์โคจิข้าวแดงที่ผลิตจากผลพลอยได้พาสตาข้าวเจ้า

2. ศึกษาคุณภาพทางเคมี กายภาพ คุณภาพด้านจุลชีววิทยา และคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของ
น้ำส้มสายชูโคจิข้าวแดงที่หมักจากผลพลอยได้พาสตาข้าวเจ้าด้วย *A. pasteurianus* TISTR 102



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

น้ำส้มสายชู

น้ำส้มสายชู (vinegar) หรือกรดอะซิติก (acetic acid) เป็นสารละลายใส มีสีหรือไม่มีสี ขึ้นอยู่กับชนิดของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต คำว่า vinegar มาจากภาษาฝรั่งเศส 2 คำ คือ vin ซึ่งแปลว่าไวน์ และ aigre ซึ่งแปลว่าเปรี้ยว การผลิตน้ำส้มสายชูเพื่อการบริโภคมีมานานพอ ๆ กับการทำไวน์ประมาณ 10,000 ปีมาแล้ว โดยชาวโรมัน และกรีกได้นำน้ำส้มสายชูที่ผลิตได้จากการปล่อยไวน์ทิ้งไว้ให้เกิดการหมักในธรรมชาติ ก่อนจะนำมาทำเจือจาง และใช้เป็นเครื่องดื่ม ในปัจจุบัน น้ำส้มสายชูเป็นเครื่องปรุงรสที่ผลิตได้จากวัตถุดิบพวกแป้งหรือน้ำตาลโดยกระบวนการหมัก 2 ระยะ คือ การหมักน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์โดยยีสต์ *S. cerevisiae* หลังจากนั้นจึงเป็นการออกซิไดซ์แอลกอฮอล์ให้เป็นกรดอะซิติกโดยแบคทีเรีย *Acetobacter* ซึ่งน้ำส้มสายชูจะต้องประกอบด้วยกรดอะซิติกไม่น้อยกว่า 4 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตรหรือร้อยละ 4 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และเอทานอลไม่มากกว่าร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ค่า pH ของน้ำส้มสายชูควรอยู่ระหว่าง 2-3.5 (คุณณี ธนะบริพัตน์, 2555)

ชนิดของน้ำส้มสายชู

น้ำส้มสายชูตามคำจำกัดความของสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (มอก. 83-2527 : น้ำส้มสายชู) หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นของเหลวใส ทำจากวัตถุดิบที่เหมาะสม เช่น ผลไม้ ธัญพืช น้ำตาลหรือกากน้ำตาล ตามกรรมวิธีการผลิตน้ำส้มสายชูแต่ละประเภท มีรสเปรี้ยวที่เกิดจากกรดอะซิติกเป็นส่วนใหญ่ น้ำส้มสายชูที่สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมรับรองให้มาตรฐาน มี 2 ชนิด คือ

1. น้ำส้มสายชูหมัก (fermented vinegar) หมายถึง น้ำส้มสายชูที่ได้จากการนำวัตถุดิบมาหมักกับส่าเหล้า (ยีสต์) แล้วนำมาหมักกับเชื้อน้ำส้มสายชูตามกรรมวิธีการผลิต
2. น้ำส้มสายชูกลั่น (distilled หรือ spirit vinegar) มี 2 ชนิด คือ น้ำส้มสายชูกลั่นชนิด distilled vinegar เป็นน้ำส้มสายชูที่ได้จากการกลั่นน้ำส้มสายชูหมัก สำหรับน้ำส้มสายชูกลั่นชนิด spirit vinegar เป็นน้ำส้มสายชูที่ได้จากการหมักเอทานอลเจือจางกับเชื้อน้ำส้มสายชูตามกรรมวิธีการผลิต แล้วนำไปกลั่นหรือกรอง

น้ำส้มสายชูที่ขายตามท้องตลาด และที่แบ่งภายใต้การควบคุมของพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหาร (ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 204 พ.ศ. 2543 เรื่อง น้ำส้มสายชู) แบ่งออกได้เป็น 3 ชนิด คือ

1. น้ำส้มสายชูหมัก (fermented vinegar) หมายถึง น้ำส้มสายชูที่ได้จากการหมักผลไม้ ธัญพืชหรือน้ำตาล ด้วยสำหรือยีสต์เพื่อให้ได้แอลกอฮอล์ แล้วหมักต่อด้วยเชื้อน้ำส้มสายชู น้ำส้มสายชูหมักจัดเป็นน้ำส้มสายชูที่มีกลิ่นหอม และรสชาติดี มีสีต่างกันตามสีของวัตถุดิบ กลิ่นหอมของน้ำส้มสายชูหมักนี้มาจากสารบางชนิดที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมัก และกลิ่นรสชาติยิ่งขึ้นเมื่อเก็บรักษาไว้เป็นเวลานาน ๆ

2. น้ำส้มสายชูกลั่น (distilled vinegar หรือ spirit vinegar หรือ white vinegar) เป็นน้ำส้มสายชูที่ได้จากการนำน้ำสุราขาวเจือจางหรือแอลกอฮอล์เจือจางมาหมักกับเชื้อน้ำส้มสายชู โดยมีการเติมเกลือแร่ และอาหารเสริมที่จำเป็นต่อการเจริญของเชื้อน้ำส้มสายชู น้ำส้มสายชูกลั่นนอกจากจะได้จากการหมักวิธีข้างต้นแล้วยังอาจได้จากการนำน้ำส้มสายชูหมักมากลั่นอีกครั้งหนึ่ง น้ำส้มสายชูที่ได้มีลักษณะใส ไม่มีสี และขาดกลิ่นรสบางอย่างที่พบในน้ำส้มสายชูหมัก

3. น้ำส้มสายชูเทียม เป็นสารละลายที่ได้จากการผสมกรดอะซิติก (glacial acetic acid) ซึ่งสังเคราะห์ขึ้นทางเคมีในน้ำบริสุทธิ์ ให้มีความเข้มข้นไม่น้อยกว่า 4 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร แต่ไม่เกิน 7 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส น้ำส้มสายชูเทียมเป็นน้ำส้มสายชูที่มีราคาถูก มีความบริสุทธิ์สูง แต่ขาดกลิ่นรสที่ดี

นอกจากนี้ยังมีน้ำส้มสายชูอีกชนิดหนึ่งเพิ่มขึ้นมา เรียกว่า “น้ำส้มสายชูปลอม” ซึ่งทำมาจากการนำกรดอินทรีย์ที่มีพิษร้ายแรง เช่น กรดกำมะถันหรือกรดเกลือเข้มข้น ซึ่งราคาถูก มาเจือจางกับน้ำแทนการใช้หัวน้ำส้มพวกกรดอะซิติกล้วนหรือกรดน้ำส้มอย่างแรง ซึ่งมีราคาแพงมาผสมน้ำ ถ้ารับประทานน้ำส้มสายชูปลอมเข้าไปจะทำให้เยื่อบุกระเพาะ และลำไส้อักเสบ อาจทำให้เป็นโรคเรื้อรัง รวมทั้งยังทำลายระบบประสาท และระบบย่อยอาหารอีกด้วย ในน้ำส้มสายชูปลอมนอกจากจะมีอันตรายจากความเข้มข้นของกรดแล้ว ยังมีสารปนเปื้อนอื่น ๆ เช่น ปรอต ตะกั่ว สารหนู ซึ่งล้วนเป็นอันตรายทั้งสิ้น และไม่ปลอดภัยต่อการบริโภค (คุณฉวี ธนะบริพัฒน์, 2555)

วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชูหมัก

วัตถุดิบต่าง ๆ ที่ไม่เป็นพิษ ประกอบด้วยน้ำผลไม้หรือสารละลายน้ำตาล สามารถนำมาใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชูได้ วัตถุดิบหลายชนิดที่นำมาใช้ได้ เช่น ผลไม้ (แอปเปิล กล้วย เปลือกกล้วย น้ำมะพร้าว อินทผลัม องุ่น มะม่วง ขนุน ส้ม ปาล์ม ลูกท้อ ลูกแพร์ สับปะรด ลูกพลัม แห้ว มะขาม เชอร์รี่ มะเขือเทศ และแตงโม) เมล็ดธัญพืช (ข้าวมอลต์ และข้าว) ผลิตภัณฑ์น้ำตาล

(กากน้ำตาล น้ำอ้อย น้ำผึ้ง และผลิตภัณฑ์นมเปิด) มันเทศ มะม่วงหิมพานต์ ชา ยางโกโก้ เนื้อเมล็ดกาแฟ หางนม เอทานอล และไวน์ ซึ่งวัตถุดิบที่แตกต่างกันจะมีผลต่อกลิ่นรส และคุณภาพของน้ำส้มสายชูด้วย น้ำส้มสายชูนอกจากจะแยกประเภทตามชนิดของการผลิตแล้ว ยังสามารถแยกออกได้ตามวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต ได้แก่

1. น้ำส้มสายชูที่หมักจากน้ำผลไม้ จัดเป็นน้ำส้มสายชูคุณภาพเยี่ยม มีกลิ่นหอม รสกลมกล่อม ราคาแพง เพราะวัตถุดิบที่ใช้ราคาแพง มีขั้นตอนในการเตรียมมาก ผลไม้ที่ใช้ในการหมัก เช่น แอปเปิล องุ่น ส้ม ลูกแพร์ สับปะรด และอื่น ๆ
2. น้ำส้มสายชูหมักได้จากพืชประเภทแป้ง เช่น มันฝรั่ง มันเทศ มันสำปะหลัง ซึ่งจะต้องมีการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลก่อน
3. น้ำส้มสายชูที่หมักได้จากเมล็ดธัญพืช เป็นน้ำส้มสายชูที่ขายตามท้องตลาดทั่ว ๆ ไป วัตถุดิบที่ใช้มีราคาถูก จึงทำให้น้ำส้มสายชูชนิดนี้มีราคาต่ำลงไปด้วย ส่วนใหญ่จะใช้เมล็ดธัญพืชพวกข้าว ข้าวมอลต์ ข้าวบาร์เลย์ ข้าวไรย์ ข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าวฟ่าง และข้าวเหนียว
4. น้ำส้มสายชูที่หมักจากน้ำตาล กากน้ำตาล น้ำผึ้ง หรืออื่น ๆ เป็นน้ำส้มสายชูที่มีคุณภาพค่อนข้างต่ำ
5. น้ำส้มสายชูที่หมักได้จากเหล้าหรือแอลกอฮอล์ เช่น ผลิตจากของเสียที่ได้จากการหมักเบียร์จากการผลิตยีสต์หรือจากเอทิลแอลกอฮอล์ที่เจือจาง

โดยทั่วไปชื่อของน้ำส้มสายชูจะมาจากชื่อของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต เช่น

1. Cider vinegar เป็นน้ำส้มสายชูที่ผลิตจากน้ำแอปเปิล โดยนำน้ำแอปเปิลที่มีความหวาน 10 °Brix หมักไว้เป็นเวลา 1 ปี จะได้น้ำส้มสายชูที่มีกรดอะซิติกร้อยละ 5 น้ำส้มสายชูชนิดนี้นิยมใช้กันมากในประเทศสหรัฐอเมริกา สวิสเซอร์แลนด์ และออสเตรเลีย เนื่องจากมีกลิ่นหอม
2. Malt vinegar เป็นน้ำส้มสายชูที่ผลิตจากข้าวมอลต์หรือธัญพืชอื่น ๆ เป็นการหมักให้เกิดแอลกอฮอล์ก่อนที่จะหมักต่อให้เป็นกรด น้ำส้มสายชูชนิดนี้ไม่ผ่านกระบวนการกลั่น ใช้กันมากในประเทศสหรัฐอเมริกา อังกฤษ และแอฟริกาใต้ แต่ malt vinegar ที่นำน้ำส้มสายชูที่หมักได้แล้วมากลั่นจะมีการผลิตในประเทศสกอตแลนด์ โดยมีขายในตลาดประมาณร้อยละ 70
3. Whey vinegar เป็นน้ำส้มสายชูที่ผลิตจากหางนมเข้มข้นโดยนำมาหมักให้เกิดแอลกอฮอล์ และหมักต่อให้เกิดกรด
4. Fruit vinegar เป็นน้ำส้มสายชูที่หมักจากผลไม้ต่าง ๆ เช่น อินทผลัม ส้ม และกล้วย
5. Sugar vinegar เป็นการนำน้ำเชื่อมจากน้ำตาลหรือกากน้ำตาลมาหมักให้เป็นแอลกอฮอล์ และหมักต่อเป็นน้ำส้มสายชู

6. Glucose vinegar เป็นน้ำส้มสายชูที่ได้จากการหมักสารละลายกลูโคสให้เป็นแอลกอฮอล์ และเป็นกรดอะซิติกในที่สุด

7. Rice vinegar เป็นน้ำส้มสายชูที่ทำจากข้าวเจ้า โดยการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลก่อนที่จะนำมาหมักเป็นน้ำส้มสายชู

8. Wine vinegar เป็นน้ำส้มสายชูที่หมักจากน้ำองุ่น กรรมวิธีการผลิต และคุณสมบัติเช่นเดียวกับน้ำส้มสายชูที่หมักจากน้ำแอปเปิล ผลิตมากในแถบยุโรป และนิยมกันแพร่หลายในประเทศฝรั่งเศส

9. Distilled vinegar หรือ spirit vinegar เป็นการใช้เอทานอลบริสุทธิ์เป็นแหล่งวัตถุดิบในการผลิตน้ำส้มสายชู โดยเอทานอลที่ใช้ในการหมัก มีความเข้มข้นร้อยละ 10-14 (โดยปริมาตร) ในประเทศสหรัฐอเมริกาจะเรียกน้ำส้มสายชูนี้ว่า distilled vinegar ส่วนในประเทศอังกฤษจะเรียกว่า spirit vinegar น้ำส้มสายชูชนิดนี้ใช้กันมากในอุตสาหกรรมอาหาร

สำหรับในประเทศไทยนั้นวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชูแบ่งออกเป็น 2 ประเภทตามกรรมวิธีในการผลิต ได้แก่ การผลิตน้ำส้มสายชูจากการหมักแอลกอฮอล์ ซึ่งเป็นการผลิตแบบใหม่แอลกอฮอล์ที่ใช้สั่งซื้อจากโรงงานสุราอยุธยา กรมสรรพสามิต ถ้าเป็นโรงงานผลิตน้ำส้มสายชูเก่าแก่ จะใช้วัตถุดิบที่สำคัญ คือ ข้าวเจ้า กากน้ำตาล และข้าวเหนียว (คุณฉนิ ณะบริพัทธ์, 2555)

ข้าว

ข้าวเป็นคำทั่วไปที่ใช้เรียกเมล็ดข้าว (rice fruit, rice grain หรือ rice seed) ซึ่งทางพฤกษศาสตร์จะหมายถึง ผล (fruit) ที่มีลักษณะเป็นผลเดี่ยว (single fruit) เกิดจากรังไข่อันเดียวชนิดลอยตัว (superior ovary) ของดอกเดี่ยวในแต่ละดอกย่อย ที่เกิดรวมกันอยู่เป็นช่อดอก ผลเดี่ยวนี้อจะติดแน่นอยู่กับผนังของรังไข่ หรือเยื่อหุ้มผล (pericarp) ซึ่งเมื่อผลสุกหรือแก่จะเป็นแห้ง (dry fruit) ที่ไม่แตก (indehiscent fruit) เรียกว่า เมล็ด (caryopsis grain) ที่มีเยื่อหุ้มผล และเปลือกหุ้มเมล็ด (seed coat หรือ testa) เชื่อมรวมกันอย่างแนบแน่นโดยตลอดผลหรือเมล็ดข้าว จะมีลักษณะแตกต่างตามพันธุ์ในด้านขนาด รูปร่าง สี การมีหาง (awn) หรือไม่มีหาง และขน (pubescence) หรือ ไม่มีขนบนเปลือกแข็ง (hull หรือ husk) ข้าวเป็นอาหารสำคัญปลูกกันในประเทศร้อนโดยมากมี 2 ชนิด คือ ข้าวเจ้า และข้าวเหนียว ข้าวที่มนุษย์ปลูกเพื่อบริโภค คือ ข้าวเอเชีย (*Oryza sativa* Linn) และข้าวแอฟริกา (*Oryza glaberrima* Steud) (สมบัติ กำมอญ, 2552)

โครงสร้างของเมล็ดข้าว

เมล็ดข้าวประกอบด้วย 2 ส่วนใหญ่ ๆ ดังนี้

1. เปลือกนอกหรือแกลบ (hull) เป็นส่วนของกลีบดอกประกอบด้วย palea และ lemma น้ำหนักเฉลี่ยประมาณร้อยละ 20 ของน้ำหนักเมล็ดข้าว เชื่อมกันโดยโครงสร้างพิเศษที่เรียกว่า hook shaped ชั้นนอกของ hull มี trichomes องค์กรประกอบส่วนใหญ่ภายใน hull ได้แก่ ลิกนิน (ร้อยละ 30) เซลลูโลส (ร้อยละ 25) และเถ้า (ร้อยละ 21) ดังนั้น ส่วนนี้จึงมีคุณค่าทางโภชนาการต่ำ แต่มีความสำคัญในการป้องกันเมล็ดจากเชื้อรา และแมลงในระหว่างการเก็บรักษา

2. ส่วนที่บริโภคได้หรือข้าวกล้อง (caryopsis, brown rice, dehull rice, husked rice หรือ cargo rice) ประกอบด้วย

2.1 เยื่อหุ้มผล (pericarp หรือ fruit coat) เป็นส่วนผิวนอกของข้าวกล้อง ประกอบด้วยเนื้อเยื่อ 3 ชั้นด้วยกัน คือ epicarp, mesocarp และ endocarp เยื่อหุ้มผลเหล่านี้มีลักษณะเป็น fibrous พังเซลล์ ประกอบด้วย โปรตีน เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส

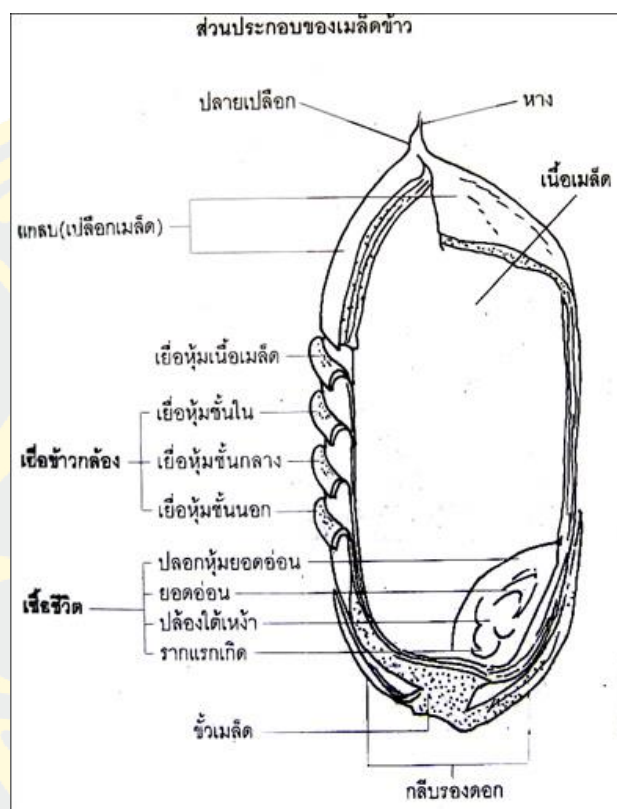
2.2 เยื่อหุ้มเมล็ด (seed coat หรือ tegmen) เป็นเซลล์ชั้นเดียวหนาประมาณ 0.5 ไมครอน อยู่ถัดจากเยื่อหุ้มผลเข้าไปประกอบด้วยเนื้อเยื่อสองชั้นเรียงกันเป็นแถวเป็นชั้นที่มีไขมันอยู่มาก

2.3 ชั้นแอลิวโรน (aleurone layer) เป็นเยื่อชั้นถัดจากเยื่อหุ้มเมล็ด ประกอบด้วย เซลล์ 1-7 ชั้น ลักษณะของเยื่อหุ้มด้านหลังของเมล็ดจะหนากว่าเยื่อหุ้มด้านท้อง ซึ่งความหนานี้จะแตกต่างกันไปตามพันธุ์ข้าว เช่น ข้าวเมล็ดป้อม-สั้นจะมีเยื่อชั้นแอลิวโรนหนากว่าข้าวเมล็ดยาว เป็นต้น และชั้นแอลิวโรนเป็นชั้นที่มีคุณค่าทางอาหารสูง ภายในชั้นแอลิวโรนประกอบด้วย โปรตีน ไขมัน วิตามิน และมีแป้งเล็กน้อย ดังนั้นเมื่อบริโภคข้าวกล้องซึ่งไม่ได้ขัดสีเอาชั้นแอลิวโรน ออกไปจึงรู้สึกกระด้างกว่าข้าวสาร

2.4 เนื้อเมล็ดหรือเนื้อข้าว (endosperm) เป็นส่วนเนื้อของเมล็ดข้าว (ประมาณร้อยละ 80 ของน้ำหนักเมล็ดทั้งหมด) ส่วนใหญ่ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตหรือแป้ง แป้งข้าวจะอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม (starch compound) กลุ่มแป้งหลาย ๆ กลุ่มจะอยู่รวมกันเป็น micelles โดยมีโปรตีน (protein body) แทรกอยู่ และไขมันเล็กน้อย แป้งข้าวแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ อะไมโลส (amylose) และอะไมโลเพคติน (amylopectin)

2.5 จมูกข้าวหรือคัพพะ (embryo) เป็นส่วนเล็ก ๆ อยู่ที่มุมล่างของเมล็ด ส่วนท้องของเมล็ดมีส่วนประกอบเป็นรากอ่อน (radical) ต้นอ่อน (plumule) เยื่อหุ้มรากอ่อน (coleorhizae) เยื่อหุ้มต้นอ่อน (coleoptile) ท่อน้ำท่ออาหาร (epiblast) และใบเลี้ยง (scutellum) ซึ่งเป็นใบเลี้ยงเดี่ยว คัพพะเป็นแหล่งสะสมอาหารสำหรับการเจริญเติบโตของต้นอ่อน จึงอุดมไปด้วยโปรตีน และไขมัน

ส่วนต่าง ๆ ยกเว้นแป้ง วิตามิน บี1 บี2 และไนอาซิน ซึ่งวิตามินเหล่านี้จะถูกตัดออกไป เมื่อผ่านกระบวนการขัดขาว ดังภาพที่ 2-1 (สมบัติ กำมอญ, 2552)



ภาพที่ 2-1 ส่วนประกอบของเมล็ดข้าว

ที่มา : Somsak (2538)

ตารางที่ 2-1 องค์ประกอบทางเคมีพื้นฐานของเมล็ดข้าว

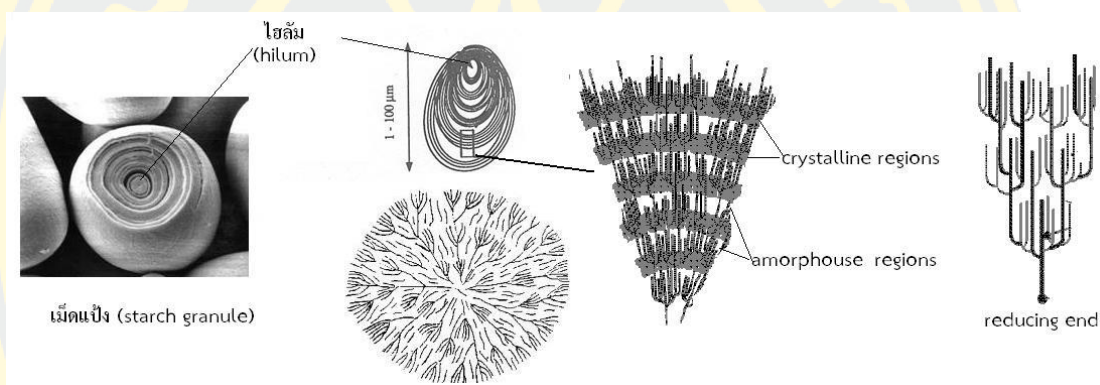
องค์ประกอบทางเคมี	กรัมต่อ 100 กรัม
โปรตีน	6.3-7.1
ไขมัน	0.3-0.5
เส้นใย	0.2-0.5
เถ้า	0.3-0.8
คาร์โบไฮเดรต	77-89
เส้นใยอาหาร	0.7-2.3

ที่มา: อรอนงค์ นัยวิกุล (2547)

แป้ง และองค์ประกอบของแป้ง

แป้ง เป็นคาร์โบไฮเดรตที่มีคาร์บอน ออกซิเจน และไฮโดรเจนเป็นองค์ประกอบในอัตราส่วน 6:10:5 แป้งเป็นโพลีแซคคาไรด์ และเป็นแหล่งพลังงานสำคัญที่พืชสังเคราะห์ขึ้น และเก็บสำรองไว้ในส่วนต่าง ๆ เช่น ในเมล็ด หัว และราก ของข้าว ข้าวโพด ข้าวสาลี มันฝรั่ง และมันสำปะหลัง เป็นต้น รูปร่าง และขนาดของเม็ดแป้งจะขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ซึ่งสามารถตรวจสอบได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ลักษณะเฉพาะของเม็ดแป้งนี้สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ชนิดของแป้งได้

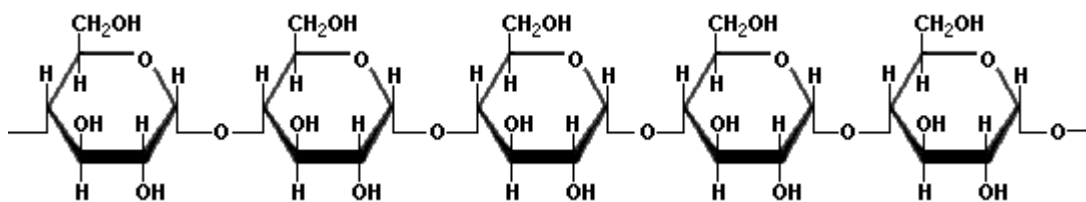
โครงสร้างของเม็ดแป้ง (ภาพที่ 2-2) มีองค์ประกอบหลัก ๆ 2 ชนิด คือ อะไมโลส และอะไมโลเพคติน ซึ่งประกอบด้วยโมเลกุลของกลูโคสต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 5,000 ขึ้นไป (เกศรินทร์ ไกลถิ่น, 2557)



ภาพที่ 2-2 โครงสร้างของเม็ดแป้ง

ที่มา : พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิชชา รัตนานนท์ (ม.ป.ป.)

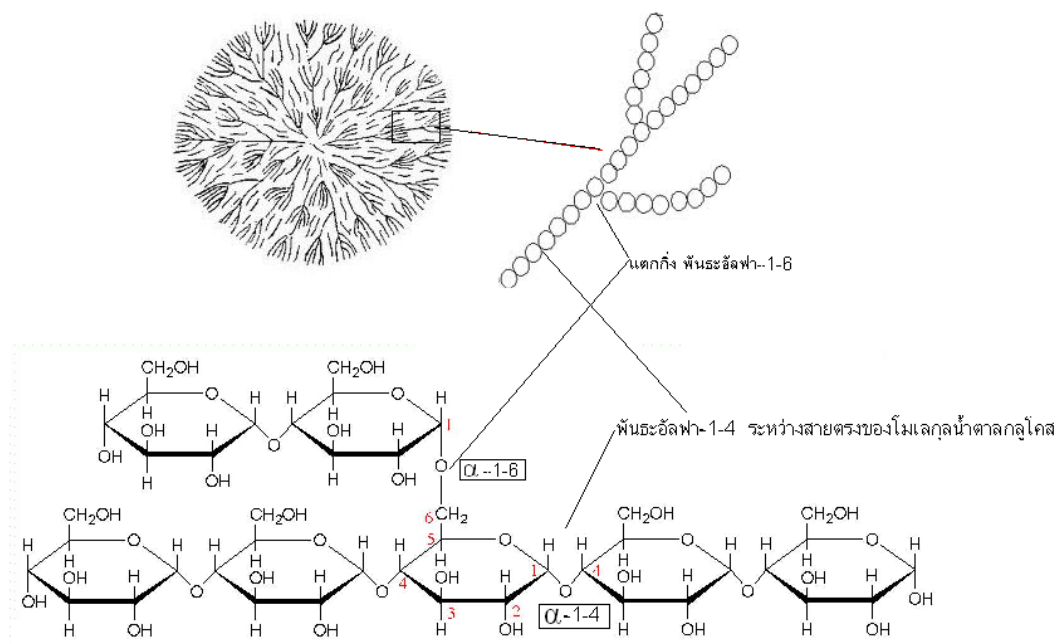
อะไมโลส (amylose) มีโครงสร้างซึ่งประกอบด้วยกลูโคสที่ต่อกันด้วยพันธะแอลฟา 1,4 ไกลโคซิดิก น้ำหนักโมเลกุลของอะไมโลสมีตั้งแต่ไม่กี่พันจนถึง 150,000 คอลตัน พันธะแอลฟา 1,4 ไกลโคซิดิกของอะไมโลสไม่ได้ต่อกันเป็นสายตรง แต่จะขดเป็นเกลียว (helix) วงซ้าย ประกอบด้วยกลูโคส 6 หน่วย ต่อ 1 เกลียว ระยะห่างระหว่างรอบของเกลียว (pitch) ประมาณ 0.8 นาโนเมตร และเส้นผ่านศูนย์กลางของเกลียวประมาณ 1.4 นาโนเมตร (ภาพที่ 2-3) ซึ่งในหนึ่งสายของอะไมโลสจะประกอบด้วยกลูโคส ตั้งแต่ 250-300 หน่วย โดยทั่วไปแป้งมีอะไมโลสเป็นส่วนประกอบอยู่ประมาณร้อยละ 20-25 ส่วนที่เหลืออีกร้อยละ 75-80 จะเป็นส่วนอะไมโลเพคติน อะไมโลสเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลายไอโอดีน จะเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างสารละลายไอโอดีนกับแป้งที่มีโครงสร้างขดเป็นเกลียวทำให้เกิดเป็นสีน้ำเงินเข้ม (deep blue) (เกศรินทร์ ไกลถิ่น, 2557)



ภาพที่ 2-3 โครงสร้างของอะไมโลส

ที่มา: พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิชยา รัตนานนท์ (ม.ป.ป.)

อะไมโลเพคติน มีโครงสร้างคล้ายขนแปรง (brush-shaped) มีสาขา (branch) แดกออกจากสายหลัก (ภาพที่ 2-4) โดยแต่ละสาขาจะแยกจากสายหลักทุก ๆ 20-30 หน่วย โครงสร้างอะไมโลเพคตินประกอบด้วยพันธะ 2 ชนิด คือ พันธะแอลฟา 1,4 ไกลโคซิดิกเป็นสายหลัก และบริเวณที่แตกสาขา (branch) จะเป็นพันธะแอลฟา 1,6 ไกลโคซิดิก ซึ่งส่วนที่เป็นสาขานี้ประกอบด้วยกลูโคสถึง 10,000 หน่วย ปริมาณอะไมโลเพคตินในแป้งแต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป โดยทั่วไปแป้งจะมีอะไมโลเพคตินเป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 70-80 และเมื่ออะไมโลเพคตินทำปฏิกิริยากับสารละลายไอโอดีนจะได้สารประกอบเชิงซ้อนสีแดงม่วงหรือน้ำตาล ซึ่งสีนี้จะค่อย ๆ จางไปเมื่อทำการย่อยแป้งด้วยกรดหรือเอนไซม์ เพราะแป้งจะถูกย่อยเป็นน้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลมอลโทส (เกสรินทร์ ไกลถิ่น, 2557)



ภาพที่ 2-4 โครงสร้างของอะไมโลเพคติน

ที่มา : พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิชยา รัตนานนท์ (ม.ป.ป.)

คุณสมบัติของแป้ง

โดยทั่วไปเม็ดแป้งมักอยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำหรือละลายได้น้อยในน้ำเย็น เนื่องจากเม็ดแป้งประกอบด้วยโมเลกุลของอะไมโลส และอะไมโลเพกตินที่มีการเรียงตัว 2 แบบ คือ ส่วนที่เรียงตัวกันหนาแน่นอย่างเป็นระเบียบ (crystalline) และส่วนที่เรียงตัวแบบหลวม ๆ ไม่เป็นระเบียบ (amorphous) ส่วนของแป้งที่มีโมเลกุลของอะไมโลส และอะไมโลเพกตินรวมตัวกันอย่างหนาแน่นเป็นระเบียบ สามารถดูดซึมน้ำไว้ได้ประมาณร้อยละ 25-30 ทำให้แป้งกระจายตัว และละลายน้ำได้น้อย แต่เม็ดแป้งจะพองตัวเมื่อได้รับความร้อน และความเหนียวจะเพิ่มขึ้น จนมีลักษณะเป็นเจล และข้นหนืด และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิของน้ำแป้งให้สูงขึ้น ประมาณตั้งแต่ 60 องศาเซลเซียส เป็นต้นไป ส่วนของ amorphous จะดูดซึมน้ำได้มากขึ้น และการจับกันของโมเลกุลในส่วน crystalline เริ่มคลาย และลดความหนาแน่นลง โมเลกุลที่เริ่มคลายตัวออกจากกันสามารถรับน้ำได้ ทำให้เม็ดแป้งพองตัวเพิ่มขึ้น โมเลกุลในส่วน crystalline ที่เหลืออยู่จะเกิดสภาพคล้ายกับร่างแห เรียกว่า micelle network ซึ่งยึดเหนี่ยวกันไว้ทำให้เม็ดแป้งยังสามารถคงสภาพอยู่ได้ แต่อาจมีโมเลกุลของอะไมโลส และอะไมโลเพกตินที่มีขนาดเล็กสามารถกระจายตัวออกมาจากเม็ดแป้ง ทำให้เกิดการละลาย เมื่อเพิ่มอุณหภูมิแป้งให้สูงขึ้นไปอีก ส่วน crystalline ที่ยังคงเหลืออยู่จะคลายตัว ทำให้เม็ดแป้งพองตัวเต็มที่จนแตกในที่สุด (gelatinization) ทำให้เกิดการละลายมากขึ้น สารละลายน้ำแป้งจะหนืดและใสขึ้น และช่วงอุณหภูมิเจลาติไนเซชัน (gelatinization temperature) แป้งแต่ละชนิดจะมี gelatinization temperature ที่แตกต่างกัน ขอบเขตของการเกิดเจลาติไนเซชันขึ้นอยู่กับเวลา และอุณหภูมิที่ใช้ในการให้ความร้อน จุดเริ่มต้น และช่วงเวลาของการเกิดเจลาติไนเซชันขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของแป้ง และชนิดของแป้ง การใช้ความดันที่สูงขึ้นเป็นการเหนี่ยวนำให้เกิดการเจลาติไนเซชันที่ดีขึ้น (เกศรินทร์ ไกลถิ่น, 2557)

กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากข้าว

น้ำส้มสายชูหมักจากข้าว เป็นน้ำส้มสายชูหมักชนิดหนึ่งที่มีการทำกันมานานกว่า 3,000 ปีมาแล้ว พบการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากข้าวในประเทศจีน และญี่ปุ่น ซึ่งสูตรดั้งเดิมของชาวจีนในมณฑลชานซี ประเทศจีน จะใช้ธัญพืช ข้าวบาร์เลย์ และถั่ว หมักกับหัวเชื้อกรดอะซิติก จนได้น้ำส้มสายชูหมักสีเข้ม มีรสหวาน ใช้สำหรับปรุงอาหาร และใช้ดื่มก่อนมื้ออาหารตามความเชื่อที่ว่า จะทำให้มีสุขภาพแข็งแรง และอายุยืน สำหรับญี่ปุ่นจะใช้ข้าวเป็นหลักในการหมักจนได้น้ำส้มสายชู เพื่อใช้เป็นเครื่องปรุงในการทำซูชิหรือปลาดิบ นอกจากนี้ น้ำส้มสายชูยังช่วยฆ่าเชื้อแบคทีเรียในปลาดิบด้วย น้ำส้มสายชูหมักจากข้าวทำมาจากไวน์ข้าวหรือสาโทหรือสาเกนั่นเอง ถ้าใช้ข้าวขาวหมักก็จะได้น้ำส้มสายชูข้าวที่มีสีออกเหลืองอ่อน ๆ คล้ายสีของฟางข้าว แต่ถ้าใช้ข้าว

กลี๋ยงก็จะออกสีขุ่นคล้ายมีรสชาติขุ่นนวล กลิ่นหอมหวาน อุดมไปด้วยธาตุอาหารกรดอะมิโนหลายชนิด มีสรรพคุณในทางยา ช่วยบำรุงสุขภาพร่างกาย (ประวีณา ลาภา, 2554)

การย่อยแป้งด้วยเอนไซม์

การย่อยแป้งด้วยเอนไซม์มีหลักการ คือ การตัดโมเลกุลของแป้งให้มีขนาดเล็กลงด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ที่มีความจำเพาะเจาะจง และไม่ต้องอาศัยอุณหภูมิสูง แต่ต้องมีขั้นตอนที่ทำให้เม็ดแป้งมีการเกิดเจลลิตินในเซชัน (gelatinization) เอนไซม์จึงจะทำงานได้ดี เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยแป้งมีหลายชนิด และมีความจำเพาะต่างกัน เอนไซม์ในกลุ่มอะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยแป้ง พบได้ทั่วไปทั้งจากพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ โดยจะถูกปล่อยออกมาจากเซลล์ (extracellular enzyme) เอนไซม์ชนิดนี้สามารถสลายพันธะแอลฟา 1,4 ไกลโคซิดิก และแอลฟา 1,6 ไกลโคซิดิก ที่มีอยู่ในอะไมเลส และอะไมโลเพคติน ซึ่งเป็นองค์ประกอบของแป้งให้ได้เป็นน้ำตาล เอนไซม์อะไมเลสแบ่งออกได้เป็น 4 ประเภท คือ เอนไซม์เอกซ์โซอะไมเลส (exoamylase) เอนไซม์เอ็นโดอะไมเลสหรือเอ็นโดไกลโคซิเดส (endoamylase หรือ endoglycosidase) เอนไซม์ดีبرانซิง (debranching enzyme) และเอนไซม์ทรานส์เฟอเรส (transferase) ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1. เอนไซม์เอกซ์โซอะไมเลส

เอนไซม์อะไมเลสในกลุ่มของเอกซ์โซอะไมเลส ได้แก่เอนไซม์เบต้าอะไมเลส (β -amylase) อะไมโลสกลูโคซิเดสหรือกลูโคอะไมเลส (amylglucosidase หรือ glucoamylase) และแอลฟาไกลูโคซิเดส (α -glucosidase)

1.1 เบต้าอะไมเลส เป็นเอนไซม์ที่กระทำการสลายพันธะแอลฟา 1,4 ไกลโคซิดิกของอะไมโลส และอะไมโลเพคติน แต่ไม่สามารถสลายพันธะแอลฟา 1,6 ไกลโคซิดิกของอะไมโลเพคตินได้ โดยกิจกรรมการสลายอะไมโลส และอะไมโลเพคตินจากปลายด้าน non-reducing ที่มีหมู่คาร์บอนิลซึ่งจะถูกออกซิไดซ์ได้ง่าย และจะสลายพันธะไกลโคซิดิกระหว่างน้ำตาลกลูโคสทุก ๆ หน่วยกลูโคส ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยด้วยเบต้าอะไมเลส คือ น้ำตาลมอลโตส และเบต้าลิมิตเดครทรินต์ ค่า pH ที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์อยู่ระหว่าง 6.8-7.0 และอุณหภูมิอยู่ในช่วง 40-50 องศาเซลเซียส อะไมโลสกลูโคซิเดสหรือกลูโคอะไมเลส เป็นเอนไซม์ที่สามารถสลายพันธะแอลฟา 1,4 ไกลโคซิดิก และพันธะแอลฟา 1,6 ไกลโคซิดิกของอะไมโลส และอะไมโลเพคตินจากปลายด้าน non-reducing ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยด้วยอะไมโลสกลูโคซิเดสหรือกลูโคอะไมเลส คือ น้ำตาลกลูโคสเพียงอย่างเดียว ค่า pH ที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์อยู่ระหว่าง 4.5-5.0 ส่วนอุณหภูมิอยู่ในช่วง 40-60 องศาเซลเซียส

1.2 แอลฟา-กลูโคซิเดส มีคุณสมบัติการทำงานของเอนไซม์เหมือนกันกับกลูโคอะไมเลส แต่ต่างกันว่าแอลฟา-กลูโคซิเดส สามารถย่อยสลายแป้งที่เป็นมอลโตโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้น ๆ ได้ดีกว่ากลูโคอะไมเลส ค่า pH เหมาะสมอยู่ในช่วง 6-8 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (เกศรินทร์ โกลถิ่น, 2557)

2. เอนไซม์เอ็นโคอะไมเลสหรือเอ็นโคไกลโคซิเดส

เอนไซม์อะไมเลสในกลุ่มของเอนไซม์เอ็นโคอะไมเลสหรือเอ็นโคไกลโคซิเดส ได้แก่ เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (α -amylase หรือ α -1,4 glucan-4-glucano hydrolase) ทั้งนี้แอลฟาอะไมเลส มีคุณสมบัติในการสลายพันธะแอลฟา 1,4 ไกลโคซิดิกของอะไมโลส และอะไมโลเพคตินแบบสุ่ม แต่ไม่สามารถสลายพันธะแอลฟา 1,6 ไกลโคซิดิกของอะไมโลเพคตินได้ ผลลัพธ์ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส คือ น้ำตาลมอลโตส แอลฟาลิมิตเดรกตรินต์ที่ประกอบด้วยกลูโคส ตั้งแต่ 4 หน่วย ขึ้นไป และโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีความยาวแตกต่างกันออกไป เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์เกิดขึ้นแบบสุ่ม ค่า pH ที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 4.5-6.0 และอุณหภูมิประมาณ 60-70 องศาเซลเซียส นอกจากนี้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสยังมีชื่อทางการค้าอื่น ๆ เช่น Taka amylase A, Buclamase, Foretizyme และ Termamyl (เกศรินทร์ โกลถิ่น, 2557)

3. เอนไซม์ดีปรานซิ่ง

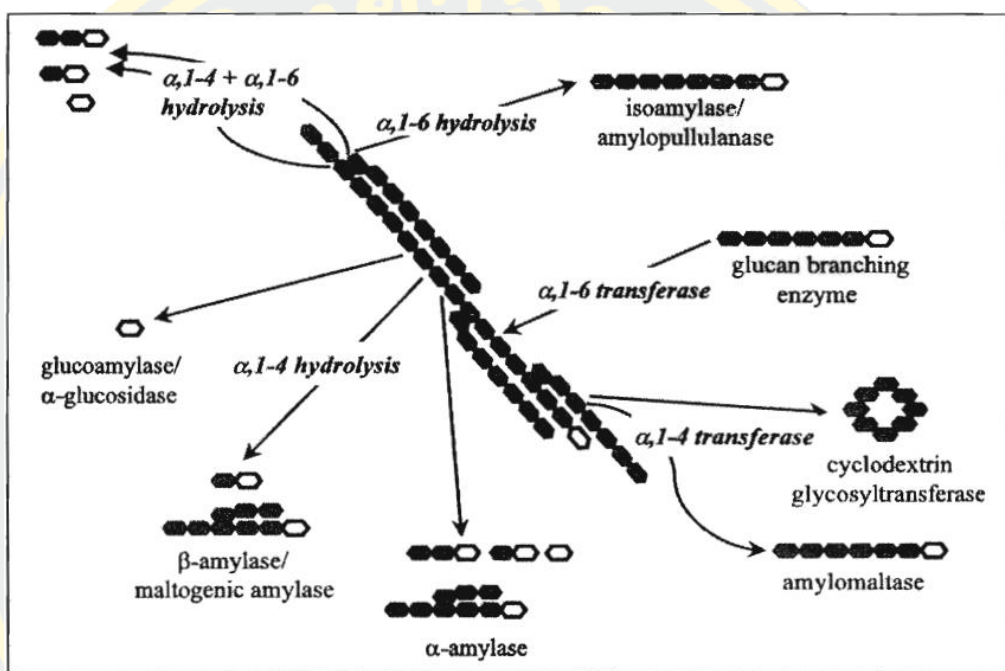
เอนไซม์อะไมเลสในกลุ่มของเอนไซม์ดีปรานซิ่ง ได้แก่ เอนไซม์พอลลูลานเนส (pullanase) และเอนไซม์ไอโซอะไมเลส (isoamylase) เอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้สามารถสลายพันธะแอลฟา 1,6 ไกลโคซิดิกได้อย่างเดียว เอนไซม์พอลลูลานเนสพบครั้งแรกในแบคทีเรีย *Aerobacter aerogenes* โดยเอนไซม์นี้สามารถย่อยสลายพอลลูแลนซึ่งประกอบขึ้นจากหน่วยย่อยของน้ำตาลกลูโคสเชื่อมต่อด้วยพันธะแอลฟา 1,4 ไกลโคซิดิกจำนวน 3 โมเลกุล (มอลโตไตรออส) และทุก ๆ 3 โมเลกุลจะเชื่อมต่อเข้าด้วยกันด้วยพันธะแอลฟา 1,6 ไกลโคซิดิก เมื่อย่อยด้วยเอนไซม์พอลลูลานเนส ผลลัพธ์ที่ได้ คือ น้ำตาลมอลโตไตรออส นอกจากนี้เอนไซม์พอลลูลานเนสยังสามารถสลายพันธะแอลฟา 1,6 ไกลโคซิดิกของอะไมโลเพคตินได้ ค่า pH ที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์อยู่ระหว่าง 5.0-7.0 และอุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 40-50 องศาเซลเซียส ส่วนเอนไซม์ไอโซอะไมเลสสลายพันธะแอลฟา 1,6 ไกลโคซิดิกของอะไมโลเพคติน แต่ไม่สามารถย่อยสลายพอลลูแลนได้ ค่า pH ที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 5.0-6.4 และอุณหภูมิประมาณ 40-52 องศาเซลเซียส (เกศรินทร์ โกลถิ่น, 2557)

4. ทรานส์เฟอเรส

เอนไซม์อะไมเลสในกลุ่มของทรานส์เฟอเรสมีหลายชนิด เช่น อะไมโลมอลเตส (amylamaltase) ไซโคลเดรกตรินต์ไกลโคซิลทรานส์เฟอเรส (cyclodextrin glycosyltransferase)

และเอนไซม์برانซึ่ง (branching enzyme) เอนไซม์ทรานส์เฟอเรสเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่ที่ไม่ใช่หมู่ไฮโดเจน จากสารตั้งต้นตัวหนึ่งไปยังโมเลกุลของตัวรับที่ไม่ใช่ น้ำ เรียกปฏิกิริยานี้ว่า donor : acceptor group transferred- transferase (เกศรินทร์ ไกลถิ่น, 2557)

การทำงานของเอนไซม์กลุ่มอะไมเลสแต่ละชนิดมีความจำเพาะ และแตกต่างกันออกไป ดังแสดงในภาพที่ 2-5



ภาพที่ 2-5 การทำงานของกลุ่มเอนไซม์อะไมเลส และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์แต่ละชนิด

ที่มา : Van der Maarel, Van der Veen, Uitdehaag, Leemhuis, and Dijkhuizen (2002)

จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์อะไมเลส

เอนไซม์อะไมเลสพบในสิ่งมีชีวิตทั่วไป เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อการย่อยสลายแป้ง ปริมาณเอนไซม์ที่พบในสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ จะแตกต่างกันไป แหล่งของเอนไซม์อะไมเลสที่ได้รับความนิยมมากในขณะนี้ คือ จุลินทรีย์ เนื่องจากสามารถที่จะผลิตเอนไซม์ได้ปริมาณมากในเวลาสั้น เพราะจุลินทรีย์เพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว และมีขนาดเล็กจึงใช้พื้นที่น้อย การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ที่ต้องการ มีวิธีการง่าย ๆ ใช้เวลาไม่นาน และการผลิตที่อาศัยกระบวนการหมักนั้นสามารถควบคุมระบบ และสภาวะต่าง ๆ เพื่อให้จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ได้อย่าง

สม่ำเสมอ จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ และรา (เกศรินทร์ ไกลถิ่น, 2557) แหล่งของเอนไซม์อะไมเลสแสดงในตารางที่ 2-2

ตารางที่ 2-2 ตัวอย่างสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส และคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์ที่ผลิตได้

สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส	น้ำหนักโมเลกุล (คอลลอยด์)	อุณหภูมิที่เหมาะสม (องศาเซลเซียส)
แอลฟาอะไมเลส		
<i>Bacillus subtilis</i>	41,000	-
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	49,000	70
<i>Bacillus licheniformis</i>	62,000	90
<i>Lactobacillus plantarum</i>	230,000	65
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	140,000	65
<i>Lactobacillus manihotivorans</i>	135,000	45
เบต้าอะไมเลส		
<i>Bacillus cereus</i>	35,000	50
<i>Bacillus circulans</i>	53-63,000	60
<i>Pseudomonas</i> sp. BQ 6	37,000	45-55
กลูโคอะไมเลส		
<i>Aspergillus awamori</i>	83,700-88,000	60
<i>Aspergillus niger</i>	99,000	-
<i>Aspergillus oryzae</i>	76,000	60
<i>Aspergillus oryzae</i>	38,000	40
<i>Penicillium oxalicum</i>	84,000	55-60
<i>Rhizopus delemar</i>	100,000	40
พอลิกลูตาเนส		
<i>Aerobacter aerogenes</i>	114,300	50
<i>Bacillus polymyxa</i>	48,000	60

ที่มา : Nigam and Singh (1995)

การผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสจากเชื้อจุลินทรีย์ต้องมีการควบคุมสภาวะการผลิต และการทำงานให้เหมาะสมกับเอนไซม์ที่ผลิต เช่น การผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสของราสายพันธุ์ *Aspergillus niger* ซึ่งเจริญ และผลิตเอนไซม์ได้ดีในช่วงค่า pH ระหว่าง 4.0-6.0 และเอนไซม์ที่ผลิตได้สามารถทำงานได้ดีในช่วงค่า pH ระหว่าง 5.0-8.5 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที โดยมี Ca^{2+} เป็นโคแฟกเตอร์ สำหรับแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus licheniformis* NCIB 6346 มีการรายงานว่าเจริญ และผลิตเอนไซม์ได้ดีที่ค่า pH 7.0 อุณหภูมิ 70-90 องศาเซลเซียส และเอนไซม์ที่ผลิตได้ทำงานได้ดีในช่วงค่า pH ระหว่าง 7.0-10.0 ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ส่วนแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus subtilis* ซึ่งเจริญ และผลิตเอนไซม์ได้ดีที่ค่า pH 6.5 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เอนไซม์ที่ผลิตได้ทำงานได้ดีภายใต้สภาวะที่มีค่า pH มากกว่าหรือเท่ากับ 7.0 ที่อุณหภูมิสูงกว่าหรือเท่ากับ 50 องศาเซลเซียส โดยมี Hg^{2+} , Fe^{3+} และ Al^{3+} เป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ และมี Mn^{2+} และ Co^{2+} เป็นโคแฟกเตอร์ จากการศึกษาชนิดของสับสเตรทที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสของแบคทีเรียสายพันธุ์ *B. licheniformis* ZB-05 ด้วยวิธีหมักแบบอาหารแข็ง (solid-state fermentation) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 30 พบว่า รำข้าวเป็นสับสเตรทที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส โดยมิกิจกรรมเอนไซม์สูงสุด 443 หน่วยต่อกรัม เมื่อหมักเป็นเวลา 36 ชั่วโมง และจากการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ คือ การเติมแอมโมเนียมร้อยละ 1 โดยกิจกรรมเอนไซม์สูงสุด 840 หน่วยต่อกรัม (เกศรินทร์ ไกลถิ่น, 2557)

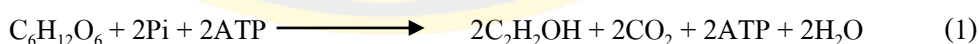
สำหรับการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสในเชิงพาณิชย์นิยมผลิตจากรา 2 สายพันธุ์ คือ *Aspergillus niger* และ *Rhizopus* sp. ซึ่งเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสามารถย่อยมอลโตโอลิโกแซคคาไรด์ให้เป็นน้ำตาลกลูโคส เช่น การผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสของราสายพันธุ์ *A. niger* UV-60 โดยการหมักแบบอาหารเหลว (submerged fermentation) โดยมีเศษอาหารเป็นสับสเตรท หมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลาที่ความเร็รรอบ 120 รอบต่อนาที พบว่าปริมาณสับสเตรทที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ คือ เศษอาหารร้อยละ 2.50 โดยน้ำหนักแห้ง สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้ 126 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อหมักเป็นเวลา 96 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังมีการประยุกต์ใช้การผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสของรา เพื่อบำบัดน้ำเสียในโรงงานอุตสาหกรรม เช่น การผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสของราสายพันธุ์ *Rhizopus oligosporus* DAR 2710 สำหรับบำบัดน้ำเสียในโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปจากแป้ง ซึ่งพบว่า สามารถลดปริมาณออกซิเจนที่สารเคมีใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ (Chemical Oxygen Demand, COD) และสารแขวนลอยได้สูงสุดร้อยละ 95 จึงช่วยลดมลพิษทางกลิ่น และลดค่าใช้จ่ายในการบำบัดน้ำเสียได้ (เกศรินทร์ ไกลถิ่น, 2557)

การหมักเอทานอล

สิ่งมีชีวิตต้องการพลังงานจากการสลายสารอาหารเพื่อใช้ในกิจกรรมต่าง ๆ ซึ่งในการสลายสารอาหารนี้ จะเปลี่ยนพลังงานของพันธะเคมีของสารอาหารให้อยู่ในรูปสารประกอบพลังงานสูง เช่น อะดีโนซีน ไตรฟอสเฟต (adenosine triphosphate, ATP) ที่เซลล์สามารถนำไปใช้ได้ การสลายสารอาหารระดับเซลล์มีทั้งแบบใช้ออกซิเจน และไม่ใช้ออกซิเจน

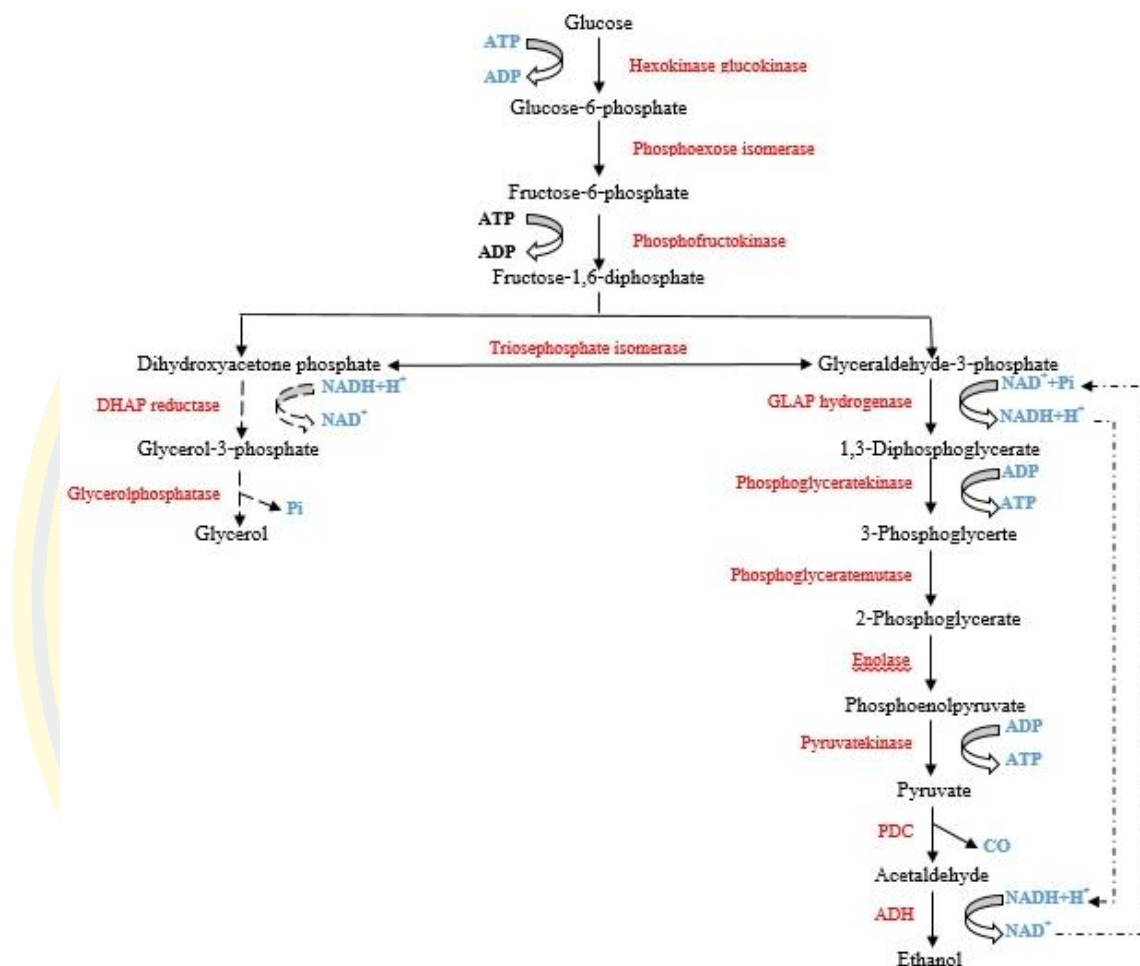
กระบวนการสลายกลูโคสแบบใช้ออกซิเจนประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ ไกลโคไลซิส วัฏจักรเครบส์ และกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอน จะได้ผลิตภัณฑ์หลายชนิด เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และ ATP แต่เมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนหรือมีออกซิเจนไม่เพียงพอ ทำให้ขาดออกซิเจนซึ่งเป็นตัวรับอิเล็กตรอนในขั้นตอนสุดท้าย จึงไม่สามารถสร้าง ATP และขาดแคลน NAD^+ ในกระบวนการไกลโคไลซิส ดังนั้นเพื่อให้ได้ ATP และกระบวนการไกลโคไลซิสไม่หยุดชะงัก ไพรูเวทจากกระบวนการไกลโคไลซิสจะถูกรีดิวส์ไปเป็นกรดแลคติกหรือเอทิลแอลกอฮอล์โดยกระบวนการหมักขึ้นอยู่กับชนิดของสิ่งมีชีวิต

จุลินทรีย์ที่นิยมใช้ในการหมักน้ำตาลเพื่อการผลิตเอทานอลที่ใช้ในการอุปโภค และบริโภค คือ ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* มีกระบวนการชีวเคมีที่ใช้ในการผลิตเอทานอล 2 ระยะ คือ ในระยะที่ 1 จะเป็นวิถีไกลโคไลซิสเพื่อการสร้างไพรูเวทซึ่งมีคาร์บอน 3 อะตอม ในระยะที่ 2 จะเป็นการทำงานของเอนไซม์ 2 ชนิด คือ ไพรูเวทดีคาร์บอกซิเลส (pyruvate decarboxylase, PDC) ที่ทำหน้าที่ตัดคาร์บอนออกจากไพรูเวทได้ผลิตภัณฑ์เป็นอะซีทอลดีไฮด์ซึ่งมีคาร์บอน 2 อะตอม ส่วนคาร์บอนที่ถูกตัดออกไปจะอยู่ในรูปคาร์บอนไดออกไซด์ หลังจากนั้นแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase, ADH) ร่วมกับโคแฟกเตอร์ คือ นิโคตินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ (nicotinamide adenine dinucleotide, NADH) รูปรีดิวส์จะทำหน้าที่เปลี่ยนอะซีทอลดีไฮด์เป็นเอทานอล สมการการเปลี่ยนกลูโคสเป็นเอทานอล (สมการที่ 1) มีดังนี้



ในการหมักเอทานอลโดยจุลินทรีย์นั้น นอกจากได้เอทานอลเป็นผลิตภัณฑ์แล้ว ยังได้คาร์บอนไดออกไซด์ และกลีเซอรอลเป็นผลพลอยได้อีกด้วย การที่จุลินทรีย์มีการสร้างกลีเซอรอลเนื่องจากความเร็วของการหมุนเวียนกลับมา (regeneration) ของ NAD^+ จากวิถีการสร้างเอทานอลซ้ำทำให้เกิดการสะสมของ glyceraldehyde 3-phosphate ผลิตภัณฑ์ คือ ทำให้อัตราเร็วของไกลโคไลซิสช้าลง การสร้างพลังงานจึงลดลงด้วย ดังนั้น เซลล์จึงแก้ปัญหาด้วยการระบาย NADH ออกทางวิถีการสร้างกลีเซอรอลโดยการทำงานของเอนไซม์ดีเอชเอพีรีดิวเตส (DHAP reductase) และกลีเซ

ออรอลฟอสเฟต (glycerol phosphatase) เพื่อนำ NAD^+ กลับมาใช้ (ภาพที่ 2-6) (มะลิวัลย์ ชีวสุวรรณ, 2556)



ภาพที่ 2-6 กระบวนการชีวเคมีที่เซลล์เปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นเอทานอล

----- แสดงวัฏจักรหมุนเวียนของ NAD^+

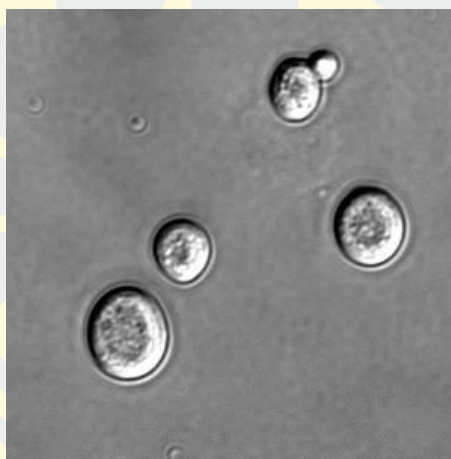
----- แสดงวิธีการหมุนเวียนกลับมาของ NAD^+ เพื่อกลับไปใช้ในไกลโคไลซิส

ที่มา : มะลิวัลย์ ชีวสุวรรณ (2556)

จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการหมักเอทานอล

ยีสต์ หมายถึง ราที่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยการแตกหน่อ (budding) หรือแบ่งตัว (fission) เนื่องจากเป็นเซลล์เดี่ยวจึงเจริญและสืบพันธุ์ได้เร็วกว่าเชื้อราที่เป็นเส้นสาย และมีการเปลี่ยนแปลงทางเคมีได้ดีกว่า เนื่องจากมีอัตราส่วนของพื้นที่ผิวต่อปริมาตรสูงกว่า ยีสต์ไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้ ซึ่งแตกต่างจากสาหร่าย และไม่เหมือนโปรโตซัวเพราะมี

ผนังเซลล์ที่แข็งแรง นอกจากนี้ยังแตกต่างไปจากแบคทีเรียส่วนใหญ่ เพราะมีขนาดใหญ่กว่า และมีลักษณะที่แตกต่างกันด้วย ยีสต์พบทั่วไปในธรรมชาติ เช่น อาศัยอยู่บนสารอินทรีย์ที่ตายแล้ว อาศัยโฮสต์ที่มีชีวิตหรืออาศัยอยู่ในดิน เป็นต้น สามารถแพร่กระจายโดยอาศัยแมลงพาไป และโดยกระแสลม ชนิดของยีสต์ในสัมพันธ์กับแหล่งที่อยู่ของเชื้อ ความสามารถที่จะอยู่รอดในธรรมชาติ องค์ประกอบของดิน อุณหภูมิ แสงแดด ความชื้น และปัจจัยอื่น ๆ โดยทั่วไปยีสต์มีขนาดเซลล์ใหญ่กว่าแบคทีเรีย โดยมีความกว้างตั้งแต่ 1-5 ไมโครเมตร และความยาว 5-30 ไมโครเมตร มีรูปร่างกลมรี สายพันธุ์ของยีสต์ที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอล คือ *S. cerevisiae* (ภาพที่ 2-7) (มะลิวัลย์ ชิวสุวรรณ, 2556)



ภาพที่ 2-7 ลักษณะเซลล์ *Saccharomyces cerevisiae*

ที่มา : Jacki and Alexandra (2012)

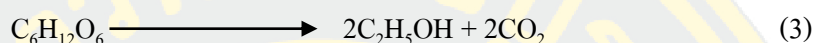
ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของยีสต์

เชื้อจุลินทรีย์เหมือนสิ่งมีชีวิตทั่วไปที่ต้องการสารอาหารพื้นฐานเพื่อการเจริญเติบโต และสร้างพลังงาน สารประกอบที่เป็นโครงสร้างของเซลล์หรือสารประกอบที่เกี่ยวข้องกับกิจกรรมของเซลล์ เช่น เอนไซม์ นอกจากสารอาหารที่เหมาะสมแล้วยังต้องมีปัจจัยทางกายภาพที่เหมาะสมอีกด้วย

1. ธาตุอาหาร

1.1 คาร์บอน เป็นสารจำพวกคาร์โบไฮเดรต ส่วนใหญ่ใช้เป็นแหล่งพลังงาน แต่จะมีบางส่วนถูกใช้เป็นส่วนประกอบของเซลล์ขึ้นอยู่กับสภาวะการเจริญเติบโต และความสามารถในการนำไปใช้ของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ ยีสต์ส่วนใหญ่สามารถใช้น้ำตาลโมลกุลคู่ได้ เช่น มอลโทส และซูโครส โดยยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* สามารถใช้มอลโทสได้ทั้งในสภาวะที่มี

ออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน ในขณะที่ *Candida utilis* สามารถใช้ในสภาวะที่มีออกซิเจนเท่านั้น นอกจากนี้ยีสต์บางสายพันธุ์ยังสามารถใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนได้ เช่น *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces chevalien* และ *Endomycopsis fibuligera* ปฏิกริยาที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการหมักในสภาวะที่มีออกซิเจน (สมการที่ 2) และในสภาวะไม่มีออกซิเจน (สมการที่ 3) แสดงดังสมการ



1.2 ไนโตรเจน ยีสต์มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 10 โดยน้ำหนักแห้ง ดังนั้น ไนโตรเจนจึงเป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต่อยีสต์ โดยทั่วไปยีสต์สามารถใช้แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เป็นแหล่งไนโตรเจน ในขณะที่ยีสต์บางสายพันธุ์สามารถใช้ยูเรียหรือกรดอะมิโนในการเจริญได้ดีกว่า เนื่องจากกรดอะมิโนทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของกลไกภายในยีสต์ แหล่งไนโตรเจนที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอล ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต และสารสกัดจากยีสต์

1.3 แร่ธาตุ ยีสต์ต้องการแร่ธาตุในการเจริญเติบโต โดยเฉพาะโพแทสเซียม และแมกนีเซียมซึ่งต้องการประมาณ 0.1-1.0 มิลลิโมลาร์ และต้องการแมงกานีส แคลเซียม เหล็ก สังกะสี ทองแดง นิกเกิล โคบอลต์ และ โมลิบดีนัมเป็นธาตุรองประมาณ 0.1-100 มิลลิโมลาร์ แต่หากมีปริมาณมากเกินไป อาจมีผลยับยั้งการเจริญเติบโต และการผลิตเอทานอลของยีสต์ได้

1.4 วิตามิน เป็นตัวควบคุมเมตาบอลิซึมของยีสต์ โดยทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ทำให้เอนไซม์ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ วิตามินที่จำเป็นต่อยีสต์ ได้แก่ ไบโอติน กรดแพนโทเทนิค และกรดไพอะมิโนไนอะซิน โฟลิก เป็นต้น

1.5 สารช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโต เป็นสารอินทรีย์เชิงซ้อนที่ยีสต์ต้องการในระดับความเข้มข้นต่ำ ซึ่งเป็นสารที่มีความจำเพาะต่อปฏิกริยาหรือบทบาทต่อโครงสร้างในเซลล์ แต่ไม่ได้ทำหน้าที่เป็นแหล่งพลังงาน เช่น กรดนิวคลีอิก กรดอะมิโน กรดไขมัน และสเตียรอยด์ เป็นต้น

2. ค่า pH เป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งในการผลิตเอทานอล โดยเฉพาะในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากค่า pH มีผลต่ออัตราการหมัก การสร้างผลิตภัณฑ์ ตลอดจนควบคุมการปนเปื้อน ยีสต์สามารถเจริญได้ในช่วงค่า pH 4.5-6.0 แต่จะเจริญได้ดีที่ค่า pH 4.0-4.5 ใน

ขณะเดียวกันพบว่า มียีสต์บางสายพันธุ์สามารถเจริญได้ที่ค่า pH ต่ำสุดประมาณ 1.5 และค่า pH สูงสุดประมาณ 8.5

3. อุณหภูมิ เมื่ออัตราการหมักเอทานอลเพิ่มสูงขึ้นจะส่งผลให้ความร้อนในระบบเพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งความร้อนที่เกิดขึ้นจะมีผลต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ ทำให้กระบวนการหมักหยุดชะงักลง และทำให้เอทานอลระเหยออกจากระบบมากขึ้น ดังนั้น กระบวนการหมักในระดับอุตสาหกรรมขนาดใหญ่จึงจำเป็นต้องมีระบบหล่อเย็น เพื่อลดอุณหภูมิระหว่างการหมัก ยีสต์บางสายพันธุ์สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 35-47 องศาเซลเซียส ในขณะที่บางสายพันธุ์สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ 0-5 องศาเซลเซียส หรือที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส เช่น *Candida frigida*, *Candida geherda* และ *Candida nivalis* ซึ่งสามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ -5 ถึง -7 องศาเซลเซียส นอกจากนี้การหมักที่อุณหภูมิต่าง ๆ ยังมีผลต่อปฏิกิริยาชีวเคมีของยีสต์ โดยการหมักที่อุณหภูมิต่ำจะมีการผลิตเอทานอลในปริมาณลดลง แต่จะมีการผลิตสารเอสเทอร์ในปริมาณมากขึ้น ได้แก่ ไอโซเอมิลอะซิเตต ไอโซบิวทิลอะซิเตต และเอทิลอะซิเตต เป็นต้น

4. ความชื้น ยีสต์ส่วนใหญ่เจริญได้ดีในสภาพที่มีความชื้นเพียงพอ แต่มียีสต์บางสายพันธุ์ที่สามารถเจริญในสภาพที่มีความเข้มข้นของเกลือหรือน้ำตาลสูง ได้แก่ ยีสต์ที่ทนต่อแรงดันออสโมซิส และยีสต์ที่ทนเกลือ ยีสต์ส่วนใหญ่ต้องการความชื้นในการเจริญเติบโตมากกว่ารา แต่น้อยกว่าแบคทีเรีย ค่ากิจกรรมของน้ำ (water activity, aw) ของยีสต์มีค่าระหว่าง 0.88-0.94 ค่ากิจกรรมของน้ำขึ้นอยู่กับลักษณะของอาหาร อุณหภูมิ ปริมาณออกซิเจน การมีหรือไม่มีสารยับยั้งการเจริญ pH และสายพันธุ์ของยีสต์

5. ออกซิเจน ในสภาพที่มีออกซิเจนในกระบวนการหายใจจะเกิดออกซิเดชันกลูโคสอย่างสมบูรณ์จนได้คาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำ แต่ถ้าเกิดออกซิเดชันไม่สมบูรณ์จะได้กรด และสารตัวกลางอื่น ๆ ผลผลิตที่มีความสำคัญ ได้แก่ เอทานอล กรด เอสเทอร์ กลีเซอรอล และแอลดีไฮด์ เป็นต้น โดยทั่วไปยีสต์จะเจริญในสภาพที่มีออกซิเจนได้ดีกว่า เนื่องจากยีสต์จะนำออกซิเจนไปใช้ในการสลายอาหารให้เป็นพลังงานมากกว่า ยีสต์จึงสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วในระยะล็อกเฟส (log phase) แต่เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง การเจริญของยีสต์ในช่วงนี้จะให้ปริมาณเอทานอลค่อนข้างต่ำ ยีสต์จะผลิตกรดน้ำส้มทำให้ไวน์มีรสเปรี้ยว และมีกลิ่นบูด ในขณะที่สภาพที่ไม่มีออกซิเจน ยีสต์จะแบ่งตัวได้น้อยกว่า แต่จะให้ปริมาณเอทานอลได้ดีกว่า นอกจากนี้ยังมียีสต์บางชนิดที่สามารถเจริญได้เฉพาะในสภาพที่ไม่มีอากาศ แต่ไม่มีความสามารถในการหมัก ได้แก่ *Rhodotomili*, *Sporolomyces* และ *Endomycosis* เป็นต้น

6. คาร์บอนไดออกไซด์ ผลผลิตที่ได้จากกระบวนการหมักเอทานอล คือ เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ โดยน้ำตาลกลูโคส 1 โมล จะได้คาร์บอนไดออกไซด์ 2 โมล หรือร้อยละ

44.89 ซึ่งมีปริมาณมากกว่าจากเอทานอล กระบวนการหมักเอทานอลในระบบใหญ่จะมีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์สูง ทำให้แรงดันในระบบเพิ่มขึ้น ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงยีสต์จึงจำเป็นต้องใช้ระบบที่มีการระบายคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อป้องกันการระเบิด

7. ความเข้มข้นของเอทานอล เอทานอลเป็นผลิตภัณฑ์หลักที่ได้จากการหมัก เมื่อมีการสะสมของเอทานอลเพิ่มมากขึ้นในระหว่างการหมัก จะทำให้ยีสต์เกิดความเครียด เนื่องจากเอทานอลมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโต และอาจทำให้ยีสต์ตายในที่สุด

8. สารยับยั้งการเจริญเติบโต ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ เป็นก๊าซไม่มีสี ไม่มีไอ มีกลิ่นฉุนรุนแรง ละลายน้ำได้ดี ความร้อนจะทำให้สารกลุ่มซัลไฟด์จะสลายให้ก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ เมื่อทำปฏิกิริยากับออกซิเจนในอากาศจะเกิดเป็นซัลเฟอร์ไดรอกไซด์ และรวมตัวกับน้ำเป็นกรดซัลฟูริก นิยมใช้กับการหมักเอทานอลโดยการเติมในรูปโพแทสเซียมเมแทไบซัลไฟต์ (potassium metabisulphite, KMS) เพื่อควบคุมปฏิกิริยาออกซิเดชัน และยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ธรรมชาติ มีผลกระทบต่ออัตราการลดลงของปริมาณยีสต์เริ่มต้น ทำให้ยีสต์ลดลงประมาณ 10 เท่า และทำให้เกิดระยะพักตัว (lag phase) ประมาณ 1-2 วัน ก่อนกระบวนการหมักจะเริ่มขึ้น (มะลิวัลย์ ชิวสุวรรณ, 2556)

คุณสมบัติอื่น ๆ ของยีสต์ที่เกี่ยวข้องกับการหมักเอทานอล

1. การหมักหยุดชะงัก (stuck fermentation) คือ การหยุดชะงักของกระบวนการหมัก ก่อนถึงระยะเวลาที่กำหนด ทำให้มีน้ำตาลเหลือในกระบวนการเป็นปริมาณมาก และได้เอทานอลไม่เพียงพอ สาเหตุของการหมักหยุดชะงัก ได้แก่ ขั้นตอนการเตรียมน้ำผลไม้หรือการทำน้ำผลไม้ให้ใส ซึ่งทำให้ไม่มีสารแขวนลอยที่ทำหน้าที่ช่วยกระจายออกซิเจน การหมักที่อุณหภูมิสูงเกินไปหรือน้ำผลไม้ไม่มีสารอาหารไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ ยาฆ่าแมลงที่อาจหลงเหลืออยู่ในน้ำผลไม้หรือการปนเปื้อนแบคทีเรียที่ผลิตกรดอะซิติก ควบคุมการหมักหยุดชะงัก อาจทำได้โดยการควบคุมการอากาศ การเติมสารไนโตรเจน และการเติมผนังเซลล์ของยีสต์ เพื่อดูดซับกรดไขมันที่ยีสต์ผลิตขึ้นระหว่างการหมัก ซึ่งอาจเป็นพิษต่อเซลล์ยีสต์ และเป็นการเพิ่มสารสเตอรอล (sterols) ที่จำเป็นต่อยีสต์ในสภาวะไม่มีออกซิเจน

2. ยีสต์เพชฌฆาต (killer yeasts) ยีสต์บางสายพันธุ์สามารถผลิตโปรตีนที่เป็นพิษต่อยีสต์สปีชีส์เดียวกันหรือต่างสปีชีส์กัน ทำให้การหมักหยุดชะงักได้ *S. cerevisiae* ที่นิยมใช้ในการหมักเอทานอลเป็นยีสต์ที่มีคุณสมบัตินี้ เพื่อเป็นการควบคุมยีสต์ไม่พึงประสงค์ และไม่ให้อุณหภูมิทำลายด้วยสารพิษที่ผลิตโดยยีสต์ไม่พึงประสงค์ที่พบในธรรมชาติ การตรวจสอบคุณสมบัตินี้สามารถทำได้โดยผสมยีสต์สายพันธุ์ที่ไม่ทนสารพิษ (sensitive strain) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่หลอมเหลว และเท

ลงในงานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นเขี่ยยีสต์ที่ต้องการทดสอบลงไป หากยีสต์นั้นผลิตสารพิษจะไม่เจริญรอบ ๆ โคลินิของยีสต์ที่ผลิตสารพิษ ในขณะที่สามารถเจริญได้ในบริเวณส่วนอื่นของอาหาร

3. การย่อยสลายตัวเอง (autolysis) เมื่อการหมักสิ้นสุด ยีสต์ที่ตกตะกอนอยู่จะเกิดการย่อยสลายตัวเองอย่างช้า ๆ องค์ประกอบจำพวก โปรตีน ไขมัน กรดนิวคลีอิก และโพลีแซ็กคาไรด์ จะถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ และปลดปล่อยผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ออกสู่ภายนอกเซลล์ ได้แก่ เปปไทด์ กรดอะมิโน กรดไขมัน และนิวคลีโอไทด์ซึ่งมีผลต่อรสชาติของไวน์ และอาจเป็นสารอาหารสำหรับจุลินทรีย์ปนเปื้อนได้ วิธีการตรวจหาการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ทำได้โดยการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่เพิ่มขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ (มะลิวัลย์ ชิวสุวรรณ, 2556)

การพัฒนาผลิตภัณฑ์หลังการหมักเอทานอล

1. การตกตะกอน

กระบวนการตกตะกอนเป็นวิธีการเพิ่มคุณภาพให้แก่ผลิตภัณฑ์ โดยการเติมสารที่มีคุณสมบัติในการกำจัดหรือลดปริมาณสารแขวนลอยไม่พึงประสงค์ เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะใส มีสี และกลิ่นที่ดีขึ้น สารที่ใช้ในการตกตะกอนควรเป็นสารที่ได้จากธรรมชาติ เช่น เจลาติน แทนนินหรือเบนโทไนด์ เป็นต้น ความขุ่นที่เกิดขึ้นในผลิตภัณฑ์อาจเกิดจากวัตถุดิบที่ใช้ในการหมัก เซลล์ยีสต์ เซลล์แบคทีเรีย สารแขวนลอยอื่น ๆ รวมถึงสารที่เกิดประจุขึ้นระหว่างกระบวนการบ่ม ซึ่งสารเหล่านี้จะอยู่ในรูปของโปรตีน เพคตินหรือสารที่เกิดจากการสลายสารในกลุ่มโพลีฟีนอล การดูดซับของสารระหว่างสารที่ใช้ในการตกตะกอนกับสารแขวนลอยจะทำให้ได้กลุ่มสารที่มีขนาดใหญ่ขึ้น และง่ายต่อการกรอง

2. การกรอง

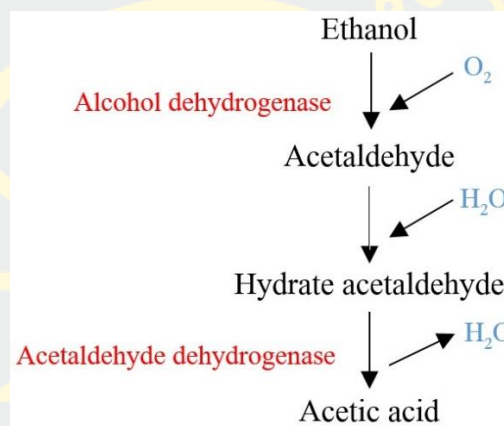
เป็นการเพิ่มคุณภาพของผลิตภัณฑ์ การกรองแบบไมโครฟิวเตรชันจะทำให้ความเข้มข้นของสี และกลิ่นของผลิตภัณฑ์ลดลง โดยขึ้นอยู่กับความดัน และอัตราการไหลของผลิตภัณฑ์

3. การบ่ม

ช่วยให้ผลิตภัณฑ์มีกลิ่นหอม และมีรสชาติที่ดีขึ้น ผลิตภัณฑ์ควรมีระยะเวลาในการบ่มที่เพียงพอ เพื่อให้เกิดการพัฒนาของกลิ่นที่สมบูรณ์ที่สุด ภาชนะที่ใช้ในการบ่มอาจเป็นขวดแก้วหรือถังสแตนเลส แต่มีข้อเสีย คือ ราคาแพง ดังนั้นในอุตสาหกรรมจึงนิยมใช้ถังไม้โอ๊กในการบ่ม เนื่องจากปฏิกิริยาเคมีจะเกิดขึ้นอย่างช้า ๆ เพื่อเปลี่ยนแปลงสารที่มีในผลิตภัณฑ์ให้อยู่ในลักษณะที่สมดุล เป็นผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกลิ่นรส (มะลิวัลย์ ชิวสุวรรณ, 2556)

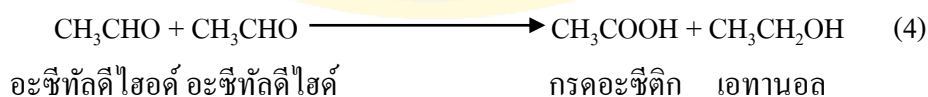
การหมักกรดอะซิติก

กระบวนการหมักกรดอะซิติกเป็นกระบวนการหมักซึ่งต่อเนื่องจากกระบวนการหมักเอทานอล โดยยีสต์ที่ทำหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสให้เป็นเอทานอล จากนั้นเอทานอลจะถูกออกซิไดซ์เป็นอะซีทัลดีไฮด์โดยออคซิเจนไนโตรจีเนสของยีสต์ ซึ่งเข้ารวมตัวกับอะซีทัลดีไฮด์ได้เป็นไฮเดรตอะซีทัลดีไฮด์ และถูกออกซิไดซ์ไปเป็นกรดอะซิติก โดยออคซิเจนไนโตรจีเนสของยีสต์ได้ออกซิไดซ์ไฮเดรตอะซีทัลดีไฮด์ให้โปรตอน 2 ตัวของไฮเดรตอะซีทัลดีไฮด์ถูกส่งผ่านไปสู่อะตอมของออกซิเจน (ภาพที่ 2-8)



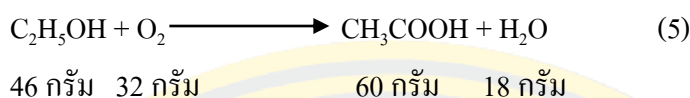
ภาพที่ 2-8 กระบวนการชีวเคมีที่เซลล์เปลี่ยนเอทานอลเป็นกรดอะซิติก
ที่มา : มะลิวัลย์ ชีวสุวรรณ (2556)

นอกจากนี้อะซีทัลดีไฮด์อาจเปลี่ยนเป็นกรดอะซิติกได้อีกแนวทางหนึ่ง โดยการทำปฏิกิริยากันเองระหว่างอะซีทัลดีไฮด์ 2 โมเลกุล ได้ผลผลิตเป็นกรดอะซิติก และเอทานอล โดยเอทานอลที่เกิดขึ้นจะถูกนำไปใช้ในการผลิตกรดอะซิติกต่อไปเป็นวัฏจักร จนกระทั่งกลายเป็นกรดอะซิติกทั้งหมด เรียกปฏิกิริยานี้ว่า ปฏิกิริยาแคนนิซซาโร (Cannizzaro reaction) ดังสมการที่ 4



การออกซิไดซ์เอทานอลเป็นกรดอะซิติกเป็นปฏิกิริยาคายความร้อน (exothermic reaction) โดยปลดปล่อยความร้อนประมาณ 8.4 เมกะจูลต่อเอทานอล 1 ลิตร แต่ในทางปฏิบัติจะเกิดความร้อนในกระบวนการต่ำกว่าทางทฤษฎี เนื่องจากพลังงานส่วนหนึ่งถูกใช้ในการผลิตเซลล์ และใช้ในการเผาผลาญภายในเซลล์ประมาณ 23 เมกะจูลต่อกิโลกรัม น้ำหนักเซลล์แห้ง ในทางทฤษฎี พบว่า การออกซิไดซ์เอทานอล 1 โมล จะได้กรดอะซิติก 1 โมล หรือจากเอทานอล 1 กรัม

สามารถเปลี่ยนเป็นกรดอะซิติกได้ 1.304 กรัม และน้ำ 0.39 กรัม โดยปฏิกิริยาการหมักกรดอะซิติกสามารถสรุปได้ดังสมการที่ 5 (มะลิวัลย์ ชิวสุวรรณ, 2556)



จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการหมักกรดอะซิติก

แบคทีเรียกรดอะซิติก (acetic acid bacteria) จัดอยู่ในสกุล Acetobacteraceae แบคทีเรียกรดอะซิติกที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำส้มสายชูสามารถแบ่งออกเป็น 2 จินัส ได้แก่ *Acetobacter* และ *Gluconobacter* ซึ่งแต่เดิมเรียก *Gluconobacter* ว่า *Acetomonas* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างกลมรี แท่งสั้นตรงหรือโค้งงอเล็กน้อย ขนาด $0.6-0.8 \times 1.0-1.4$ ไมโครเมตร อาจอยู่เป็นเซลล์เดี่ยว คู่หรือเรียงต่อกันเป็นสาย (ภาพที่ 2-9) บางสายพันธุ์ไม่สามารถเคลื่อนที่ และบางสายพันธุ์เคลื่อนที่ได้โดยอาศัยแฟลกเจลลารอบตัว (peritrichous flagella) หรือแฟลกเจลลาด้านขั้ว (polar flagella) ส่วนมากสามารถสร้างแคปซูล สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรดอะซิติกตั้งแต่ร้อยละ 2-11 ไม่สร้างเอนโดสปอร์ ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต (obligate aerobe) เพราะไม่สามารถใช้สารอื่น ๆ นอกจากออกซิเจนเป็นตัวรับไฮโดรเจนตัวสุดท้ายในกระบวนการเปลี่ยนอาหารให้เป็นพลังงาน บางสายพันธุ์สามารถสร้างรงควัตถุสีน้ำตาลที่ละลายน้ำ โคลโลนิมีสีขาว แต่เมื่อเซลล์อยู่รวมกันมาก ๆ อาจมีสีชมพูเนื่องจากอิทธิพลของสารพอร์ไฟรินที่เชื้อผลิตขึ้น สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิระหว่าง 5-42 องศาเซลเซียส แต่จะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เจริญได้ในสภาวะที่มีค่า pH 7.0-8.0 ให้ผลบวกกับการทดสอบการสร้างเอนไซม์อะซิเตส แต่ให้ผลลบกับการทดสอบเอนไซม์ออกซิเดส ไม่สามารถย่อยเจลาติน ไม่สร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ สามารถออกซิไดซ์เอทานอลเป็นกรดอะซิติก ซึ่งกรดอะซิติกจะถูกออกซิไดซ์ต่อเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำสามารถใช้เอทานอล กลูโคส และกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญได้ (มะลิวัลย์ ชิวสุวรรณ, 2556)



ภาพที่ 2-9 ลักษณะของแบคทีเรียกรดอะซิติก

ที่มา : Instruments Direct Services Limited (n.d.)

Acetobacter และ *Gluconobacter* มีคุณสมบัติเหมือนกันหลายประการ (ตารางที่ 2-3) มักเจริญปะปนกันในถังหมักน้ำส้มสายชูตามธรรมชาติ เนื่องจากสามารถเจริญได้ดีในสภาวะแวดล้อมที่คล้ายคลึงกัน ดังนั้น การแยก *Acetobacter* sp. ออกจาก *Gluconobacter* sp. จะใช้คุณสมบัติที่แตกต่างกันบางประการ ได้แก่ คุณสมบัติการออกซิไดซ์กรดอะซิติกเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำในสภาวะที่ขาดเอทานอลของ *Acetobacter* sp. ซึ่งเรียกคุณสมบัตินี้ว่า การเกิดการออกซิเดชันเกิน (overoxidation) ซึ่งถือเป็นการออกซิไดซ์ที่สมบูรณ์ แต่ *Gluconobacter* sp. จะขาดคุณสมบัตินี้ดังกล่าวหรือการใช้คุณสมบัติการออกซิไดซ์แลคเตทเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ของ *Acetobacter* sp. ที่จัดเป็นพวกแลคตาไฟล์ คือ เจริญได้ดีเมื่อใช้แลคเตทเป็นแหล่งคาร์บอน ในขณะที่ *Gluconobacter* sp. จัดเป็นพวกไกลโคไฟล์ คือ เจริญได้ดีเมื่อใช้กลูโคสแต่ไม่สามารถใช้แลคเตท *Gluconobacter* sp. สามารถผลิตกรดกลูโคนิกจากกลูโคสได้ดี ไม่สามารถสร้างแผ่นฝ้าบนอาหารเหลว และเจริญไม่ดีในอาหารที่มีเอทานอลเป็นองค์ประกอบ และมีความสามารถในการออกซิไดซ์เอทานอลเป็นกรดอะซิติกค่อนข้างต่ำ ดังนั้น การผลิตน้ำส้มสายชูจึงนิยมใช้ *Acetobacter* สำหรับเป็นกล้าเชื้อในการหมักกรดอะซิติก ซึ่ง *Acetobacter* แต่ละสายพันธุ์จะมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดอะซิติกแตกต่างกัน การผลิตน้ำส้มสายชูจะเลือกใช้สายพันธุ์ที่ให้ปริมาณกรดอะซิติกสูงกว่า 4 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร แบคทีเรียกรดอะซิติกที่นิยมใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชู ได้แก่ *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus*, *Acetobacter peroxidans* และ *Gluconobacter oxydans* ตามลำดับ ซึ่งมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดอะซิติกสูง และสามารถทนต่อสภาวะความเป็นกรดได้ดี (มะลิวัลย์ ชิวสุวรรณ, 2556)

ตารางที่ 2-3 คุณสมบัติของแบคทีเรียสกุล *Acetobacter* และ *Gluconobacter*

คุณสมบัติ	Gluconobacter	Acetobacter
Flagellation	polar or none	peritrichous or none
Growth at pH 4.5	+	+
Oxidation of:		
Ethanol to acetic acid at pH 4.5	+ (M)	+ (S)
Acetic acid to CO ₂	-	+
Acetate to CO ₂	-	+
Lactate to CO ₂	+/-	+
Glucose to gluconate	+	d
Amino acid	-	+
Krebs cycle	-	+
Production of 5-ketogluconate	+	d
Ketogenesis	+	d
Quinones Q9	-	+
Quinones Q10	+	-
Hydrolysis of:		
Lactose	-	-
Starch	-	-
Gelatin	-/W	-
Greenish and/or fluorescent pigments	-	-

หมายเหตุ M = ปานกลาง; S = แข็งแรง; W = อ่อนแอ; d = สายพันธุ์ที่เป็นบวกร้อยละ 11-89
ที่มา : มะลิวัลย์ ชิวสุวรรณ (2556)

ถึงแม้ว่าปริมาณกรดอะซิติกที่ได้จากการหมักของ *Acetobacter* sp. จะสูงกว่าปริมาณกรดอะซิติกที่ได้จากการหมักของ *Gluconobacter* sp. แต่กระบวนการหมักกรดอะซิติกของ *Acetobacter* มักเกิดปฏิกิริยาออกซิเอชันเกินทำให้กระบวนการหมักกรดอะซิติกหยุดชะงักก่อนเวลาอันควร ส่งผลให้ปริมาณกรดอะซิติกที่ได้ลดลง สาเหตุของการเกิดออกซิเดชันเกิน ได้แก่ การขาดแคลนหรือการลดลงของสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของแบคทีเรียกรดอะซิติก การหมักในอุณหภูมิไม่เหมาะสม การให้อากาศหรือออกซิเจนไม่เพียงพอ เป็นต้น (มะลิวัลย์ ชิวสุวรรณ, 2556)

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียกรดอะซิติก

แบคทีเรียทุกชนิดต้องการสารอาหารในการเจริญเติบโต โดยแบคทีเรียแต่ละชนิดมีอัตราการเจริญเติบโตแตกต่างกันขึ้นอยู่กับปัจจัยทางกายภาพ ดังนี้

1. ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอนเป็นแหล่งพลังงานที่มีผลต่อการผลิตชีวมวลเซลล์ (biomass) ของจุลินทรีย์หรือการสร้าง primary metabolites และ secondary metabolites โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนจะใช้แหล่งคาร์บอนในการสร้างเซลล์ประมาณร้อยละ 10 ส่วนจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนจะใช้แหล่งคาร์บอนในการสร้างเซลล์ประมาณ 50-55% จุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะใช้คาร์บอนเป็นแหล่งพลังงาน โดยเฉพาะน้ำตาล glucose นอกจากนี้ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนยังเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญ ซึ่งมีผลต่อแรงดัน osmotic และ water activity

2. ชนิดและปริมาณไนโตรเจน

จุลินทรีย์มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบประมาณ 8-10% ของน้ำหนักแห้งของเซลล์ จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความต้องการแหล่งไนโตรเจน และความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจนเป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการเจริญเติบโตแตกต่างกันไป เช่น แบคทีเรียในกลุ่ม autotrophic microorganisms สามารถใช้เกลือของแอมโมเนียม หรือไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน ในขณะที่แบคทีเรียในกลุ่ม heterotrophic microorganisms สามารถใช้กรดอะมิโนชนิดต่างๆ เป็นแหล่งไนโตรเจน แหล่งของไนโตรเจนสามารถแบ่งเป็น 2 แหล่ง คือ 1) แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน เช่น แอมโมเนียม เกลือแอมโมเนียม และไนเตรท 2) แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน อาจใช้ในรูปแบบกรดอะมิโน โปรตีน หรือยูเรีย โดยทั่วไปจุลินทรีย์จะเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอินทรีย์ไนโตรเจนได้ดีกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอินทรีย์ไนโตรเจน อย่างไรก็ตามกระบวนการหมักบางอย่าง ถ้าใช้สารประกอบไนโตรเจนจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้รวดเร็ว อาจทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการผลิตได้น้อยลง

3. ค่า pH

การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ถูกควบคุมโดยกระบวนการเมตาบอลิซึม ซึ่งมีเอนไซม์เป็นตัวการสำคัญ โดยมีค่า pH ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของเอนไซม์ ค่า pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน โดยทั่วไปจะเจริญได้ดีที่ค่า pH ค่อนข้างเป็นกลางประมาณ 6.5-7.5 ยกเว้นแบคทีเรียที่ผลิตกรดจะเจริญได้ดีที่ค่า pH ต่ำกว่าปกติ เช่น แบคทีเรียกรดแลกติก และแบคทีเรียกรดอะซิติก เป็นต้น นอกจากนี้ค่า pH ยังมีผลต่อการขนส่งสารอาหารเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ ซึ่งเยื่อหุ้มเซลล์มีคุณสมบัติไม่ยอมให้ H^+ และ OH^- ผ่าน

ความเข้มข้นของสารเหล่านี้จึงยังคงที่ในไซโทพลาสซึม ถึงแม้สภาพแวดล้อมรอบเซลล์จะมี H^+ และ OH^- ปริมาณมากก็ตาม เมื่อกรดอะมิโนในอาหารเลี้ยงเชื้อถูกดีคาร์บอกซิเลตจะทำให้ค่า pH เพิ่มขึ้น เนื่องจากมีการผลิตสารเอมีน โดยปกติเซลล์แบคทีเรียจะมีประจุลบ ในการขนส่งอาหาร สารประกอบที่ไม่มีประจุ จะสามารถเข้าสู่เซลล์ได้ ในขณะที่การขนส่งสารที่มีประจุจะไม่สามารถ เข้าสู่เซลล์

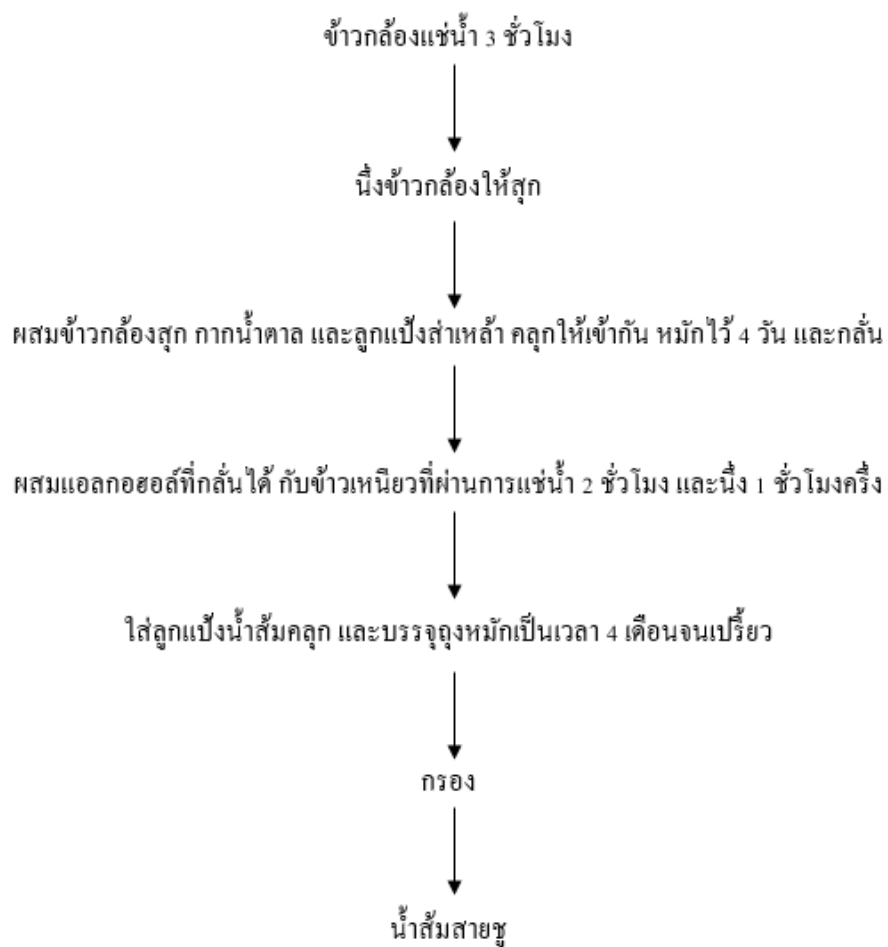
4. อัตราการให้อากาศ

ออกซิเจนเป็นธาตุชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โดยเฉพาะพวกที่ต้องการอากาศ ปริมาณออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อจะเป็นตัวควบคุมอัตราการเจริญเติบโต และการผลิตสารเมตาบอไลต์

Acetobacter sp. เป็นจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศในการดำรงชีวิต เนื่องจากไม่สามารถใช้สารอื่นนอกจากออกซิเจนเป็นตัวรับไฮโดรเจนตัวสุดท้ายในกระบวนการเปลี่ยนอาหารเป็นพลังงาน จึงพบว่าการหมักน้ำส้มสายชูที่ไม่มีกรให้อากาศ แบคทีเรียกรดอะซิติกจะเจริญอยู่ที่ผิวหน้าของน้ำหมัก ทำให้มองเห็นเป็นแผ่นฟิล์ม (มะลิวัลย์ ชิวสุวรรณ, 2556)

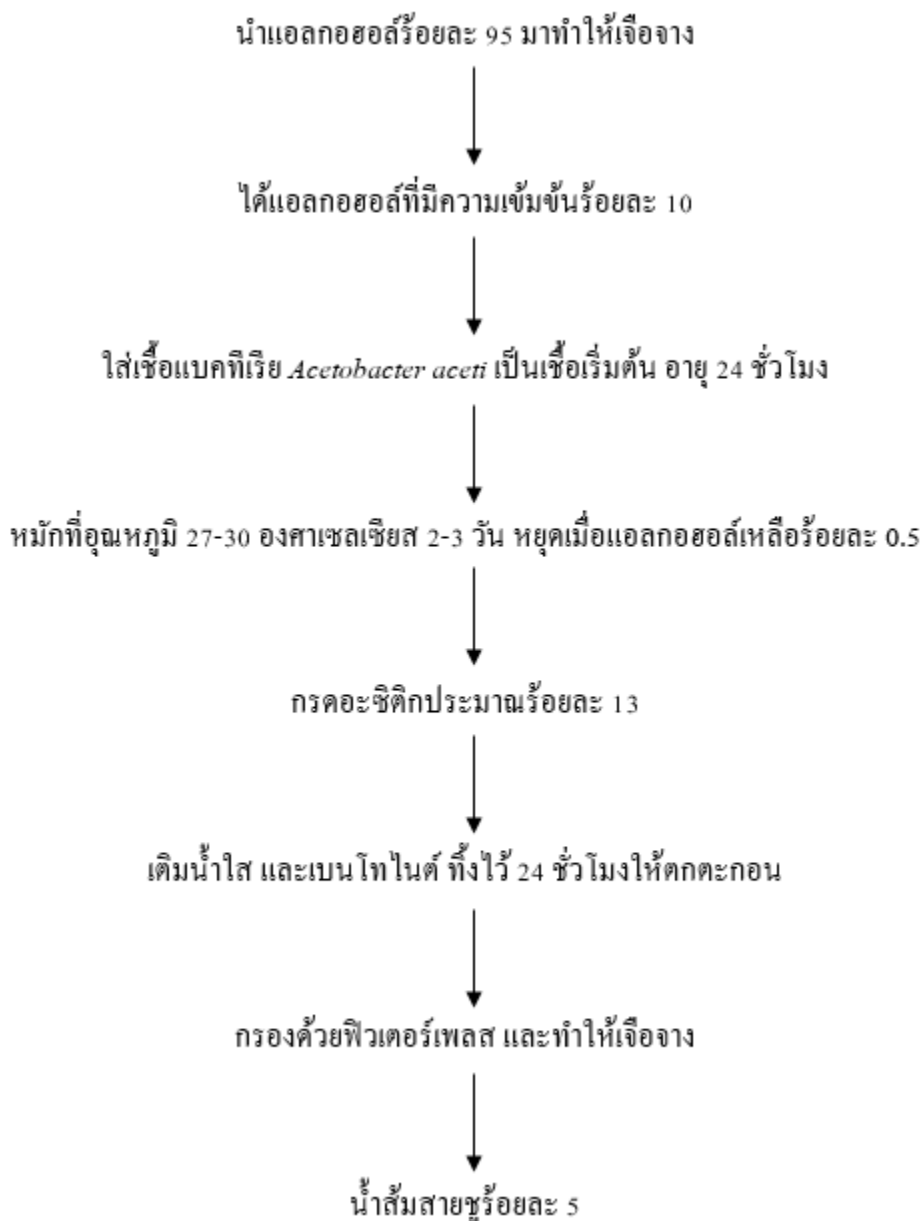
การผลิตน้ำส้มสายชูในประเทศไทย

ในระหว่างสงครามโลกครั้งที่สอง ประเทศไทยเกิดการขาดแคลนน้ำส้มสายชู ดังนั้นชาวจีนจึงทำน้ำส้มสายชูออกจำหน่าย โดยอาศัยเชื้อจากธรรมชาติ และใช้ข้าวเหนียวเป็นวัตถุดิบในการหมัก แต่ในปัจจุบันการผลิตน้ำส้มสายชูในประเทศไทยมี 2 วิธี คือ การผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากข้าว และการผลิตน้ำส้มสายชูกลั่นจากแอลกอฮอล์ สำหรับแผนภูมิการผลิตน้ำส้มสายชูทั้งสองวิธีนี้ได้แสดงไว้ในภาพที่ 2-10 และ 2-11 ตามลำดับ



ภาพที่ 2-10 กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมัก

ที่มา : คุณฉวี ฐานะบริพัทธ์ (2555)



ภาพที่ 2-11 กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูกลั่น

ที่มา : คุณฉวี ฐนะบริพัฒน์ (2555)

การทำน้ำส้มสายชูให้ใส

น้ำส้มสายชูที่ผลิตได้ปกติจะมีลักษณะขุ่น จึงจำเป็นต้องทำให้ใสโดยการกรองหรือใช้สารทำให้ใส (fining agent) ในการกรองจะใช้ไคอะตอมมาเซียส เอิร์ธ (diatomaceous earth) หรืออัลตราฟิวเตรชัน (ultrafiltration) ซึ่งการกรองจะช่วยกำจัดสารแขวนลอยต่าง ๆ เช่น แบคทีเรีย และอื่น ๆ ส่วนการทำน้ำส้มสายชูให้ใสโดยใช้สารทำให้ใสจะใช้เบนโทไนท์ (bentonite) เป็นส่วน

ใหญ่ โดยจะใช้ในปริมาณ 500-3,000 กรัมต่อน้ำส้มสายชู 1,000 ลิตร ปริมาณที่ใช้มากหรือน้อยจะขึ้นอยู่กับความขุ่นของน้ำส้มสายชูที่ผลิตได้ โดยจะใส่เบนโทไนท์ลงไป และตั้งทิ้งไว้เป็นเวลาหลายชั่วโมง จนกระทั่งน้ำส้มสายชูใส และสะดวกต่อการกรอง (คุณณี ธนะบริพัฒน์, 2555)

การฆ่าเชื้อในน้ำส้มสายชู

น้ำส้มสายชูที่ผลิตได้มักจะต้องนำมาฆ่าเชื้อแบบพาสเจอร์ไรซ์ก่อนการบรรจุหรือหลังการบรรจุขวด โดยความร้อน และเวลาที่ใช้จะแตกต่างกันไป แต่จะอยู่ในช่วง 60-66 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วินาที หรืออาจนำมาฆ่าเชื้อโดยเติมซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO₂) ลงไป ซึ่งสามารถใช้ได้ถึง 70 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยจะต้องเติมลงไปทันทีก่อนการบรรจุขวด เพราะซัลเฟอร์ไดออกไซด์สามารถถูกออกซิไดซ์ได้อย่างรวดเร็ว มีผลทำให้สูญเสียประสิทธิภาพได้ (คุณณี ธนะบริพัฒน์, 2555)

การเสื่อมเสียของน้ำส้มสายชู

การเสื่อมเสียของน้ำส้มสายชูอาจเกิดได้หลายสาเหตุ เช่น โลหะ และเกลือของโลหะที่ปนมากับวัตถุดิบ อาจเป็นสาเหตุทำให้น้ำส้มสายชูขุ่น และเปลี่ยนสีได้ โดยเฟอร์รัสไอออน (ferrous ion) อาจถูกออกซิไดซ์ให้เป็นเฟอร์ริกไอออน (ferric ion) และไปรวมกับแทนนิน ฟอสเฟต หรือโปรตีนมีผลทำให้น้ำส้มสายชูขุ่น นอกจากนี้แล้วความขุ่นของน้ำส้มสายชูยังอาจเกิดจากเกลือของดีบุกหรือทองแดง และสีที่เข้มของน้ำส้มสายชูอาจเกิดจากการทำปฏิกิริยาของเหล็กกับแทนนิน หรือปฏิกิริยาของออกซิเดส

หนอนน้ำส้มสายชู *Anguillula aceti* ซึ่งพบทั่วไปในถังหมักของกระบวนการหมักแบบเร็ว และแบบออร์ลินส์ สามารถทำให้น้ำส้มสายชูเสื่อมเสียโดยทำให้เกิดความขุ่น นอกจากนี้ยังทำให้แบคทีเรียที่ผลิตกรดอะซิติกจมลงสู่ก้นถังหมัก ทำให้ไม่สามารถผลิตกรดอะซิติกได้

จุลินทรีย์ที่ทำให้น้ำส้มสายชูเสื่อมเสียโดยทำให้เกิดกลิ่นรสผิดปกติไป มักเกิดจากแบคทีเรีย *Lactobacillus* และ *Leuconostoc* โดยปะปนมากับน้ำผลไม้ที่ใช้ในการหมัก นอกจากนี้ยังมีฟิล์มยีสต์ ("wine flowers") รา และสาหร่ายบางชนิด ที่สามารถออกซิไดซ์กรดอะซิติกให้เป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำ ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน แต่การเสื่อมเสียของน้ำส้มสายชูที่สำคัญที่สุด คือ การสร้างเมือกในปริมาณมาก โดยแบคทีเรียที่ผลิตกรดอะซิติก ซึ่งเมือกที่เกิดขึ้นในปริมาณมากกว่าปกตินี้จะลดอัตราการผลิตกรดอะซิติกลง และยังมีผลในการขัดขวางการให้อากาศในกระบวนการหมักอีกด้วย เชื้อแบคทีเรียที่ผลิตน้ำส้มสายชูหลายชนิดสามารถทำให้เกิดเมือก

(เซลล์โลส) แต่แบคทีเรียที่เป็นสาเหตุสำคัญที่สุดตัวหนึ่ง คือ *A. aceti* subsp. *xylinum* (คุยฉี ธารณะบริพัฒน์, 2555)

ประโยชน์ของน้ำส้มสายชู

ในปัจจุบันน้ำส้มสายชูเป็นสารอินทรีย์ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรม โดยมีการผลิตน้ำส้มสายชูเพื่อการบริโภคกันทั่วโลก ในระดับครัวเรือนมีการใช้น้ำส้มสายชูในการเตรียมอาหาร การปรุงรส และอื่น ๆ สำหรับในระดับอุตสาหกรรมอาหารมีการนำน้ำส้มสายชูมาใช้ในการหมักคองอาหารพวกผัก ปลา นำมาใช้ในการทำน้ำสลัด น้ำซอสหรือมีสตาร์ด กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูเป็นกระบวนการหมักที่เก่าแก่ ซึ่งนอกจากจะใช้เป็นสารปรุงแต่งทำให้อาหารมีกลิ่นรสเฉพาะแล้ว ยังมีคุณสมบัติในการถนอมอาหารไม่ให้เกิดการเน่าเสีย ป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ที่สร้างสปอร์ และสร้างสารพิษในอาหารต่าง ๆ ด้วย นอกจากนี้การบริโภคน้ำส้มสายชูยังมีประโยชน์ต่อร่างกายด้วย ดังนี้

1. ช่วยระบบการย่อยอาหารให้ดีขึ้น เนื่องจากน้ำส้มสายชูเป็นกรด ดังนั้นเมื่อรับประทานเข้าไปแล้วจะช่วยให้อาหารย่อย และถ้าใส่เป็นกรดอ่อน ๆ ทำให้การย่อยอาหารมีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น
2. ช่วยให้ระบบขับถ่ายเป็นไปอย่างปกติ ทำให้ผู้บริโภคมิผิวพรรณผ่องใส ไม่เป็นสิวฝ้า
3. น้ำส้มสายชูมีสูตรทางเคมี $\text{CH}_3\text{-COOH}$ ซึ่งเป็น โมเลกุลที่มีขนาดเล็กกว่าน้ำตาล ทำให้ร่างกายสามารถดูดซึมได้ดี ผู้ที่บริโภคมักไม่ค่อยหิว จึงเหมาะสมสำหรับผู้ที่ต้องการลดความอ้วนหรือผู้ที่ต้องการลดอาหาร และช่วยละลายไขมันในเส้นเลือด นอกจากนี้ผู้ที่รับประทานน้ำส้มสายชูเป็นประจำจะไม่เป็นโรคไขข้ออักเสบ
4. สามารถนำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรต่าง ๆ เช่น น้ำมะพร้าว น้ำผลไม้หรือกากสับปรดมาทำน้ำส้มสายชูได้เป็นอย่างดี และเป็นการหลีกเลี่ยงการรับประทานน้ำส้มสายชูปลอมที่เป็นอันตรายต่อร่างกาย

นอกเหนือจากการใช้ประโยชน์ในด้านอาหารแล้ว น้ำส้มสายชูยังมีประโยชน์ในด้านอื่น ๆ เช่น ในสมัยโบราณมีการใช้น้ำส้มสายชูในการจุดไฟในประเทศจีน ในระหว่างสงครามโลกครั้งที่สองก็มีการผลิตน้ำส้มสายชูจากกากน้ำตาลในแถบแอฟริกาตะวันออกเพื่อใช้เป็นสารตกตะกอนน้ำยางในการผลิตยาง มีการใช้น้ำส้มสายชูในการผลิตตะกั่วขาว ซึ่งตะกั่วคาร์บอเนตที่ผลิตขึ้นนี้จะใช้ในสี และเครื่องสำอาง นอกจากนี้น้ำส้มสายชูยังนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ได้ด้วย (คุยฉี ธารณะบริพัฒน์, 2555)

ข้าวแดง

ข้าวแดงเป็นผลิตภัณฑ์จากการหมักแห้งด้วยเชื้อรา *Monascus* sp. โดยใช้ข้าวเป็นวัตถุดิบ เชื้อจะสร้างเส้นใยขนไหม และปกคลุมเมล็ดข้าว และสร้างสารสีขึ้นภายในเส้นใยหรือบางส่วนจะถูกปลดปล่อยออกมาจากเส้นใยทำให้เมล็ดข้าวมีสีแดงเข้ม ข้าวแดงมีต้นกำเนิดในประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน ใช้ประโยชน์กันมานาน และแพร่หลายมากในประเทศแถบเอเชีย ได้แก่ ไทย ฟิลิปปินส์ จีน ไต้หวัน อินโดนีเซีย ญี่ปุ่น เพื่อปรุงแต่งสีของอาหาร และก่อให้เกิดกลิ่นเฉพาะในอาหารหมักคอง ตัวอย่างของอาหารที่ใช้สารสีจากข้าวแดง ได้แก่ เต้าหู้ยี้ ปลาแห้ง ปลาเค็ม เห็ด เห็ดเหียง กะปิ โดยเฉพาะปลาแห้งเป็นอาหารที่ชาวไทยนิยมรับประทานกันอย่างแพร่หลาย ในทางภาคใต้ชายฝั่งตะวันออก ได้แก่ สงขลา นครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานี นอกเหนือจากการใช้ปรุงแต่งอาหารแล้ว ข้าวแดงยังเป็นองค์ประกอบหนึ่งในสูตรยาจีนเพื่อใช้รักษาโรค

ข้าวแดงมีชื่อเรียกจากภาษาจีนว่า อังคัก (ang-kak) ซึ่ง อัง แปลว่า แดง ส่วน คัก แปลว่า เมล็ดที่มีเปลือก นอกจากนี้ยังมีชื่อเรียกอย่างอื่นอีก ดังนี้ ข้าวแดงจีนหรือไชนีสเรดไร (Chinese red rice) แอนคัก (ankak) แอนคา (anka) เบนนิโคจิ (beni-koji) เอกาโคจิ (aga-koji) และเรด โมลด์ไร (red mold rice) ข้าวแดงที่บดละเอียดแล้ว บางคนเรียกว่า แป้งแดงหรือทรายแดง

ข้าวแดงจัดว่าเป็นเมล็ดธัญพืชที่มีเชื้อจุลินทรีย์ขึ้นปกคลุม เพื่อใช้เป็นแหล่งของเอนไซม์ เชื้อรา *Monascus* spp. สามารถสร้างเอนไซม์ได้หลายชนิด เช่น กลูโคอะไมเลส โปรติเอส เป็นต้น นอกจากนี้ข้าวแดงยังให้กลิ่น (ทิพย์รัตน์ คนตรี, 2552)

เชื้อราโมนาสคัส (*Monascus purpureus*)

เชื้อรา *Monascus* เป็นเชื้อราที่ใช้ในกระบวนการแปรรูปอาหารมาแต่โบราณ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ประเทศจีน อินโดนีเซีย และไทย เนื่องจากเป็นเชื้อราที่นิยมใช้ในกระบวนการหมัก ซึ่งระหว่างกระบวนการหมักเชื้อรา *Monascus* สามารถสร้างสารสี และสารต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย โดยทั่วไปนิยมใช้ข้าวเป็นแหล่งอาหารให้การหมักผลิตภัณฑ์อาหารที่ได้จากการหมัก เช่น ข้าวแดง สุราเห็ดเหียง และเต้าหู้ยี้ เป็นต้น เชื้อรา *Monascus* เป็นเชื้อราที่เคยจัดอยู่ในวงศ์ (Family) Aspergillaceae อันดับ (Order) Plectascales แต่ปัจจุบันจัดอยู่ในวงศ์ Monascaceae กลุ่ม (Class) Ascomycetes กลุ่มย่อย (Subclass) Plectomycetidae อันดับ Eurotiales เส้นใยมีผนังกั้น (septate) มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ และไม่อาศัยเพศ เส้นใยมีการแตกกิ่งก้านสาขาจำนวนมาก มีการสร้างโคนิเดีย (conidia) เจริญมาจากโคนิดีโอฟอร์ (conidiophore) อาจเป็นสปอร์เดี่ยวหรือต่อกันเป็นสายสั้น ๆ มี 2-6 สปอร์ โคนิเดียรูปไข่ขณะอ่อนจะไม่มีสี เมื่ออายุ

มากขึ้นจะมีสีแดง ขนาด $9.0-10.5 \times 7.0-9.0$ ไมโครเมตร การงอกของโคนิเดียจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับ
กับสูตรอาหาร (สุชาดา ไม้สนธิ์ และสิริธร ธีระเวทย์, 2559)

สารเมแทบอไลต์ของเชื้อราโมแนสคัส

สารเมแทบอไลต์ที่สำคัญของเชื้อราโมแนสคัสแบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ เอนไซม์ (enzyme) สารเมแทบอไลต์ปฐมภูมิ (primary metabolites) และสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolites) โดยสารเมแทบอไลต์ที่มีความสำคัญทางด้านอุตสาหกรรมอาหาร และยาส่วนใหญ่ คือ สารสี (pigment) โมนาโคลิน เค (monacolin K) กาบา (γ -aminobutyric acid, GABA) และซิตรีนิน (citrinin) ดังแสดงในตารางที่ 2-4

ตารางที่ 2-4 สารเมแทบอไลต์ที่มีประโยชน์จากเชื้อราโมแนสคัส

เอนไซม์	เมแทบอไลต์ปฐมภูมิ	เมแทบอไลต์ทุติยภูมิ
1. กลูโคอะไมเลส	1. เอทิลแอลกอฮอล์	1. สารสี (สีแดง เหลือง และส้ม)
2. โปรติเอส	2. กรดอินทรีย์	2. กาบา (γ -aminobutyric acid)
3. แอลฟา-กาแลคโตซิเดส	3. วิตามินบี 2	3. โมนาโคลิน เค (monacolin K)
4. แอลฟา-อะไมเลส	4. ไขมัน	4. ซิตรีนิน (citrinin)
5. ไรโบนิวคลีเอส	5. กรดไขมัน	5. สารประกอบอินทรีย์
		6. สารช่วยรวมตะกอน (flocculants)
		7. คูมาริน (coumarin)
		8. สารถนอมอาหาร (preservative)
		9. โคอเอนไซม์ Q10
		10. สารให้กลิ่นหอมกลุ่มเมทิลคีโตน (methyl ketones)
		11. สารแอนคาลาคโตน (ankalactone)
		12. สารที่มีฤทธิ์ต้านการกลายพันธุ์ (antimutagenics)

ที่มา : รุ่งลักษณ์ ประทุมชัย (2559)

1. สารสี

ปัจจุบันยังไม่มีผลการศึกษาระบบการสังเคราะห์สารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิประเภท โพลีคีไทด์ (polyketide) ทางชีวเคมีอย่างชัดเจน แต่ได้มีการพิสูจน์ทางเคมีโดยใช้เทคนิคการติดฉลากสารด้วยสารไอโซโทป (isotopically labeled compounds) โพลีคีไทด์เกิดจากกรดอะซิติก (acetic acid) รวมกันกับสารมาโลเนต (malonate) แล้วเกิดกระบวนการดั่งสารคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งคล้ายกับการสังเคราะห์กรดไขมัน แต่การเกิดโพลีคีไทด์ไม่มีกระบวนการรีดักชันของเบต้า-ไดคาร์บอนิล (β -dicarbonyl) ในขณะที่การสังเคราะห์กรดไขมันจะมีรีดักชันหลังกระบวนการดีคาร์บอกซิเลชัน (decarboxylation) สารโพลีคีไทด์แต่ละชนิดมีวิธีการสังเคราะห์สารแตกต่างกัน เนื่องจากต้องปรับเปลี่ยนโครงสร้างเพื่อให้สารตัวกลางเสถียรมากขึ้น กลไกที่เกิดกระบวนการสังเคราะห์ ได้แก่ การประกอบเข้ากับสาย (chain) ที่สร้างอีกส่วนหนึ่งกับสายหลัก การเติมกลุ่มเมทิล การดึงออกซิเจนออกจากโมเลกุล การนำไปสู่การมีพันธะคู่ และการเพิ่มออกซิเจนเข้าไปในโมเลกุล เป็นต้น

การพิสูจน์การเกิดโพลีคีไทด์จะใช้วิธีการติดฉลากที่คาร์บอนอะตอมด้วยสารไอโซโทป (labeled C-isotope) และการอธิบายการสังเคราะห์สารที่ผลิตโดยเชื้อรา *Monascus* sp. ใช้สารเคอร์โรไทโอรีน (sclerotiorin) และสาร โรโทโอรีน (rotiorin) เป็นแบบจำลอง เพราะสารทั้งสองชนิดมีความสัมพันธ์กับสารสีโมนาสโครูบริน (monascorubrin) สารสีรูโบรพังกาทิน (rubropunctatin) และสารสีโมนาสซิน (monascin) เนื่องจากโครงสร้างของสายหลักมีสารที่ติดฉลากด้วยสารไอโซโทป (labeled isotope) มาจากสารอะซิเตตและพอร์เมต (C1-Pools) เช่นเดียวกัน การสังเคราะห์สารสีในเส้นใยเชื้อราเกิดจากการรวมตัวของอะซิเตต 1 โมล กับมาโลเนต 3 โมล ทำให้เกิดกรดไขมันที่มีสายยาวปานกลาง เช่น กรดออกทาโนอิก (octanoic acid) จาก การสังเคราะห์วิถีกรดไขมัน (fatty acid pathway) ซึ่งจะรวมตัวกับอะซิติลโคเอ (acetyl CoA) เป็นสารดีไฮโดแอซิด และเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน (transesterification) กับโครงสร้างโครโมฟอร์เกิดเป็นสารสีส้ม โมนาสโครูบรินหรือเป็นสารรูโบรพังกาทิน ซึ่งเมื่อเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน กรดเฮกซาโนอิก (hexanoic acid) สารสีส้มจะลดลงเปลี่ยนเป็นสารสีเหลืองเกิดเป็นสารอังกักฟลาวินจากโมนาสโครูบริน ส่วนสารสีแดง โมนาสโครูบรามีน และรูโบรพังกามีนจะเกิดปฏิกิริยาเติมหมู่อะมิโน (amination) ของสารสีส้มกับแอมโมเนีย

การสกัดสารสีจากเส้นใยมีความแตกต่างกันทั้งชนิด และความเข้มข้นของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด เช่น การใช้เมทานอลคลอโรฟอร์ม เอทานอล และอะซิโตน ในการสกัดออก จากเส้นใย พบว่าตัวทำละลายที่ดีที่สุด คือ เมทานอล ซึ่งสีที่สกัดได้จะมีค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุดใน 2 ความยาวคลื่น คือ สีเหลืองที่ความยาวคลื่น 390 นาโนเมตร และสีแดงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร โดยสารสีที่สกัดได้จากข้าวแดงแบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ สารสีแดง สารสีส้ม และสารสีเหลือง

สารสีที่สร้างโดยเชื้อราโมแนสคัส จัดเป็นสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิประเภทโพลีคีไทด์ (polyketide) ในพวกเฮกซาคีไทด์ (hexaketide) เนื่องจากโครงสร้างสายหลัก (main chain) ของสารสีประกอบด้วยกลุ่มคาร์บอน 2 อะตอม (C2-unit) จำนวน 6 ยูนิต (รุ่นลักษณะมี ประทุมชัย, 2559) โดยชนิดของสารสีที่สร้างโดยเชื้อราโมแนสคัส มีดังนี้

1. โมนาสโครูบริน (monascorubrin) แยกได้ครั้งแรกพร้อมกับสารสีโมนาสโครูบรินจากเชื้อรา *M. purpureus* Wentii เป็นสารสีในกลุ่มสีเหลืองสุตร โมเลกุล คือ $C_{21}H_{26}O_5$ และน้ำหนักโมเลกุล 358 ซึ่งมีคุณสมบัติทางสเปกโทรสโคปีดังนี้ $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 225, 228, 385 นาโนเมตร มีจุดหลอมเหลว 143-155 องศาเซลเซียส สารสีโมนาสโคฟลาวินเป็นตัวเดียวกันกับสารสีโมนาสซิน (monascin) ซึ่งแยกได้จากเชื้อรา *Monascus rubiginosus* Sato อยู่ในกลุ่มสีเหลือง
2. อังกักฟลาวิน (ankaflovin) เป็นสารสีในกลุ่มสีเหลือง สุตร โมเลกุล คือ $C_{23}H_{30}O_5$ และน้ำหนักโมเลกุล 386 ซึ่งมีคุณสมบัติทางสเปกโทรสโคปีดังนี้ $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 212, 228, 382 นาโนเมตร สารสีอังกักฟลาวินมีสูตรโครงสร้างสัมพันธ์กับสารสีโมนาสซิน เช่นเดียวกับสารรูโบรพังกาทินที่มีสูตรสัมพันธ์กับสารสีโมแนสโครูบริน
3. รูโบรพังกาทิน (rubropunctatin) เป็นสารสีในกลุ่มสีส้ม สุตร โมเลกุล คือ $C_{21}H_{22}O_5$ และน้ำหนักโมเลกุล 354 สารสีรูโบรพังกาทินสามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลแอมโมเนียมในอาหารเลี้ยงเชื้อได้สารรูโบรพังกาทามิน ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยาต่อได้อีกกับสังกะสี และกรดอะซิติก ได้สารอะโปรรูโบรพังกาทามิน (aporobropunctamine) สารนี้มีผลสีชมพูเข้มสีแดง มีจุดหลอมเหลว 156-157 องศาเซลเซียส
4. โมนาสโครูบริน (monascorubrin) เป็นสารสีในกลุ่มสีส้ม สุตร โมเลกุล $C_{23}H_{26}O_5$ และน้ำหนักโมเลกุล 382 ซึ่งมีคุณสมบัติทางสเปกโทรสโคปีดังนี้ $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ 253, 302, 352 นาโนเมตร มีจุดหลอมเหลว 134-136 องศาเซลเซียส
5. รูโบรพังกาทามิน (rubropunctamine) เป็นสารสีในกลุ่มสีแดง สุตร โมเลกุล $C_{21}H_{23}O_4N$ และน้ำหนักโมเลกุล 353 สารรูโบรพังกาทามินเกิดจากสารรูโบรพังกาทามินทำปฏิกิริยากับอนุมูลแอมโมเนียม
6. โมนาสโครูบรามิน (monascorunramine) เป็นสารสีในกลุ่มสีแดงสุตร โมเลกุล คือ $C_{23}H_{27}O_4N$ และน้ำหนักโมเลกุล 381 มีจุดหลอมเหลว 207-208 องศาเซลเซียส สารโมนาสโครูบรามินเกิดจากสาร โมนาสโครูบรินทำปฏิกิริยากับอนุมูลแอมโมเนียม (รุ่นลักษณะมี ประทุมชัย, 2559)

นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยแสดงว่า โมนาสโครูบรามิน และรูโบรพังกาทามิน เป็นสารอนุพันธ์ของโมนาสโครูบริน และรูโบรพังกาทามิน ซึ่งทำปฏิกิริยากับสารประกอบที่มีเอมีน

ตามลำดับ สารสีส้มที่ผลิตโดยเชื้อราโมแนสคัสละลายน้ำได้ยากแต่เมื่อทำปฏิกิริยากับสารประกอบที่มีกลุ่มอะมิโนผ่านทางปฏิกิริยาการเปิดวง (ring-opening) และ Schiff rearrangement จะได้สารที่ละลายได้ดีขึ้น สามารถละลายในน้ำ และน้ำมัน ทนต่อการทำลายด้วยความร้อน และมีความคงตัวในช่วงค่า pH 2-10 โดยสารสีที่เชื้อรา *Monascus* sp. ผลิตขึ้นนั้น นอกจากจะเป็นสารให้สีแล้วยังมีคุณสมบัติเชิงยา เช่น สารสีเหลือง และสารสีส้ม ช่วยลดอาการอักเสบ (anti-inflammatory) รูโบรพังกาทิน (rubropunctatin) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากธรรมชาติ ช่วยในการลดมะเร็ง (natural anti-cancer agent) รูโบรพังกาทิน และ โมนาสโครูบรามิน ช่วยในการยับยั้งเซลล์ที่ผิดปกติไม่ให้มีการผลิตขึ้นอีก (cellular senescence) เป็นต้น โดยส่วนใหญ่เชื้อรา *Monascus* sp. ที่นิยมนำมาผลิตสารสีแดงมี 4 สายพันธุ์สำคัญ คือ *M. purpureus*, *Monascus ruber*, *Monascus pilosus* และ *Monascus frigidanus* ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อราทั้ง 4 สายพันธุ์ มีความแตกต่างกันทางด้านสรีรวิทยาแล้ว ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ต่างกัน เช่น เชื้อราในกลุ่ม *M. pilosus* พบการทำงานของเอนไซม์บีต้า-กาแล็กโทเลส และอัลฟา-กลูโคซิเดส เชื้อราในกลุ่ม *M. purpureus* พบกิจกรรมเอนไซม์โพลเพคเตส (polypectase) แต่พบเอนไซม์ย่อยเซลลูโลสได้เฉพาะในกลุ่มของ *M. ruber* เท่านั้น เป็นต้น (รุ่งลักษณ์ ประทุมชัย, 2559)

2. สารโมนาโคลิน เค

โมนาโคลิน เค จัดเป็นสารในกลุ่มสแตติน (statin) ได้จากกระบวนการเมแทบอลิซึมของเชื้อราที่มีเส้นใย (filament) ได้สารประกอบที่มีโครงสร้างซับซ้อนผ่านวิถีโพลีคีไทด์ (polyketide pathway) สามารถผลิตโลวาสแตติน (lovastatin) โมนาโคลิน เจ (monacolin J) โมนาโคลิน เอล (monacolin L) และมีวาสแตติน (mevastatin) โดยสารกลุ่มนี้จะทำหน้าที่ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์คอเลสเตอรอล ทำให้มีคุณสมบัติในการลดปริมาณคอเลสเตอรอลในเลือด สามารถใช้ในผู้ป่วยที่มีปริมาณไขมันในกระแสเลือดสูงได้ และยังพบว่าสารสีโมนาสโครูบริน จากเชื้อรา *Monascus anka* สามารถยับยั้งการส่งเสริมเนื้องอกในหนู เนื่องจากสารสีสามารถยับยั้งกระบวนการอักเสบอันเกิดจากสาร 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) ซึ่งเป็นสารที่ส่งเสริมการเกิดเนื้องอก

สารโมนาโคลิน เค มีผลต่อปริมาณคอเลสเตอรอล ไตรกลีเซอไรด์ ไลโปโปรตีนที่มีความหนาแน่นต่ำ และไลโปโปรตีนที่มีความหนาแน่นสูง โดยไลโปโปรตีนที่มีความหนาแน่นต่ำเป็นคอเลสเตอรอลที่ไม่ดีทำให้เลือดตกตะกอนเป็นลิ่มแล้วเกาะติดที่ผนังเส้นเลือดเป็นสาเหตุใหญ่ที่ทำให้ผนังของเส้นเลือดภายในหนาขึ้น การไหลเวียนของเลือดไม่สะดวกก่อให้เกิดการอุดตันของเส้นเลือด ส่วนไลโปโปรตีนที่มีความหนาแน่นสูง เป็นคอเลสเตอรอลที่ดี เนื่องจากนำ

คอเลสเตอรอลที่ไม่จำเป็นต่อร่างกายกลับไปสู่ตับ แล้วขับถ่ายออก เรียกกระบวนการนี้ว่า “Reverse transportation of cholesterol” ถ้าในร่างกายมีระดับไลโปโปรตีนที่มีความหนาแน่นสูงต่ำกว่า 35 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิกรัม จะมีความเสี่ยงที่จะเป็นโรคเส้นเลือดในสมอง และหัวใจอุดตัน

ในปัจจุบันมีการนำสารสกัดจากข้าวแดงมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร และทางด้านคลินิก เช่น ในด้านคลินิกมีการทดลองให้หนูได้รับข้าวแดงเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ หลังจากนั้นจะวัดปริมาณไขมันในเลือด และตับ พบว่า ความเข้มข้นของซีรั่มไตรกลีเซอไรด์ คอเลสเตอรอล เอนไซม์แอสพาเตตทรานซามิเนส (aspartate transaminase, AST) ไลโปโปรตีนที่มีความหนาแน่นต่ำมาก (very low density lipoprotein cholesterol, VLDL-C) และไลโปโปรตีนที่มีความหนาแน่นต่ำในเลือดลดลง ส่วนไลโปโปรตีนที่มีความหนาแน่นสูงต่ำ และกลูตาไธโอน (glutathione, GSH) ในเลือดเพิ่มขึ้นเล็กน้อย

ปริมาณสารโมนาโคลิน เค ในข้าวแดงสามารถวิเคราะห์ได้หลายเทคนิค เช่น เทคนิคโครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) เป็นต้น จากการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของสารโมนาโคลิน เค ด้วยเทคนิคฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรสโกปี (FTIR-spectroscopy) พบว่า สารโมนาโคลิน เค จะปรากฏหมู่ฟังก์ชันในช่วงเลขคลื่น 3548 ต่อเซนติเมตร (alcohol/phenol O-H stretching vibration), 2944-2820 ต่อเซนติเมตร (methyl และ methylene C-H stretching aliphatic vibration), 1709 ต่อเซนติเมตร (lactone และ ester carbonyl stretch C=O), 1455 ต่อเซนติเมตร (C-C stretch in ring aromatic) และ 1266-1060 ต่อเซนติเมตร (lactone และ ester C-O-C bending vibration) (รุ่งลักษณ์ ประทุมชัย, 2559)

3. สารกาบา

กาบา เป็นกรดอะมิโนที่ผลิตจากกระบวนการดีคาร์บอกซิเลชัน (decarboxylation) ของกรดอะมิโนกลูตามิก (glutamic acid) กรดนี้จะมียับยั้งบทบาทสำคัญในการทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาท (neurotransmitter) ในระบบประสาทส่วนกลาง นอกจากนี้กาบายังถือเป็นสารสื่อประสาทประเภทสารยับยั้ง (inhibitor) โดยจะทำหน้าที่รักษาสมดุลในสมองที่ได้รับการกระตุ้นซึ่งช่วยทำให้สมองเกิดการผ่อนคลาย และนอนหลับสบาย อีกทั้งยังทำหน้าที่ช่วยกระตุ้นต่อมไร้ท่อ (anterior pituitary) ซึ่งทำหน้าที่ผลิตฮอร์โมนที่ช่วยในการเจริญเติบโต (Human growth hormone, HGH) ทำให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อ ทำให้กล้ามเนื้อเกิดความกระชับ และเกิดสารต้านไขมัน (lipotropic) ซึ่งเป็นสารป้องกันการสะสมไขมัน ดังนั้น จึงได้มีการนำสารกาบามาใช้ในวงการแพทย์ เพื่อการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาทต่าง ๆ หลายโรค เช่น โรควิตกกังวล โรคนอนไม่หลับ และโรคลมชัก เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีผลวิจัยด้านสุขภาพกล่าวว่าข้าวกล้องที่ประกอบด้วยกาบามีผลช่วยลดความ

ค้นโพลีไฮดรอกซีโพลีโปรตีนที่มีความหนาแน่นต่ำ ลดอาการอัลไซเมอร์ ลดน้ำหนัก ทำให้ผิวพรรณดี ตลอดจนใช้ในการบำบัดโรคระบบประสาทส่วนกลางได้

ในกระบวนการผลิตข้าวแดงนั้น กรดกลูตามิกซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่สำคัญจะถูกสร้างขึ้นในระหว่างขั้นตอนของการนึ่งข้าว จากนั้นเอนไซม์โปรติเอส และเอนไซม์คาร์บอกซิเปปติเดส ทำการเปลี่ยนกรดกลูตามิกให้เป็นสารกาบา และจะปล่อยออกมาในระหว่างการหมักข้าวแดง ซึ่งปริมาณของสารกาบาที่เกิดขึ้นในการหมักข้าวแดงนั้นจะมีปริมาณแตกต่างกันออกไปแล้วแต่นิวเคลียสของสายพันธุ์เชื้อรา *Monascus* ที่ใช้ในการหมัก การวิเคราะห์ปริมาณของสารกาบาในข้าวแดง สามารถทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูง และจากการวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันของสารกาบาด้วยเทคนิคฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรสโคปี พบหมู่ฟังก์ชันในช่วงเลขคลื่น 3525 ต่อเซนติเมตร (OH bond stretching), 2992 ต่อเซนติเมตร (C-H stretching), 1770 ต่อเซนติเมตร (lactone), 1450-1150 ต่อเซนติเมตร(carboxyl group) และ 1038 ต่อเซนติเมตร (terminal hydroxyl group C-O) (รุ่งลักษณ์ ประทุมชัย, 2559)

4. สารซิทรีนิน

ซิทรีนินเป็นสารพิษจากเชื้อราส่วนใหญ่จะพบจากเชื้อราสกุล *Penicillium* และ *Aspergillus* ที่ปนเปื้อนในอาหารประเภทธัญพืช ผลไม้ และถั่ว คนจะได้รับซิทรีนินจากการบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนเข้าไป โดยสารซิทรีนินพบครั้งแรกจากการแยกเชื้อรา *Penicillium citrinum* ในปี 1931 ต่อมาในปี 1951 พบปัญหาข้าวเหลือง “yellow rice problem” ในข้าวที่ประเทศไทย ส่งออกไปยังประเทศญี่ปุ่น เพราะมีการปนเปื้อนของเชื้อรา *P. citrinum* และตรวจพบซิทรีนินจากเชื้อราในกลุ่ม *Penicillium* สายพันธุ์อื่น เช่น *Penicillium verrucosum* สามารถสร้างสารพิษที่มีชื่อว่า โอครา ท็อกซิน เอ (Ochratoxin A, OTA) และซิทรีนินพร้อมกัน ซึ่งเป็นสารพิษที่มักพบปนเปื้อนในธัญพืช เช่น ข้าวสาลี และข้าวบาร์เลย์ เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีเชื้อราสกุลอื่นที่สามารถสร้างซิทรีนินได้ เช่น *Aspergillus terreus*, *Aspergillus carneus* และ *Aspergillus niveus* โดยปกติแล้วสารซิทรีนินมักถูกนำไปใช้เป็นสารปฏิชีวนะในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และ โปรโตซัว แต่อย่างไรก็ตาม สารซิทรีนินในปริมาณสูงจะมีผลต่อการทำงานของตับ และไตของมนุษย์ และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม นอกจากนี้ยังมีผลทำให้เกิดการขยายตัวของหลอดเลือดทำให้ระบบการไหลเวียนเลือดผิดปกติ และยังทำให้หลอดเลือดดำอย่างเฉียบพลัน โดยมีรายงานว่าซิทรีนินที่ความเข้มข้น 1.8-4.7 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถทำลายเซลล์เพาะเลี้ยงจากไตของตัวอ่อนของมนุษย์ (Human embryonic kidney cell) ได้ถึงร้อยละ 50 นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อรา *Monascus* หลายสายพันธุ์มีสาร โมนาสซิดิน เอ (monascidin A) ทำหน้าที่ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ โดยสาร โมนาสซิดิน เอ ที่แยกได้จากเชื้อรา *Monascus* ถูกบ่งชี้ว่าเป็นสารตัวเดียวกับซิทรีนิน กลไกการสังเคราะห์ทางชีวภาพของซิทรีนิน

ตรินินจาก *M. ruber* ATCC 96218 โดยตรวจวัด [^{13}C] ซิตรินินหลังจากที่มีการเติม [^{13}C] อะซิเตทลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า การสังเคราะห์ซิตรินินจากเตตระคีไทด์ (tetraketide) แตกต่างจากการสังเคราะห์จากเพนตะคีไทด์ (pentaketide) เช่นเดียวกับการสร้างซิตรินินในเชื้อราสกุล *Penicillium* และ *Aspergillus* (รุ่งลักษณ์ ประทุมชัย, 2559)

องค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา (US Food and Drug Administration, FDA) มีการออกคำเตือนผู้บริโภคให้หลีกเลี่ยงการใช้ผลิตภัณฑ์ข้าวแดง เนื่องจากผลิตภัณฑ์อาจมีการปนเปื้อนของสารซิตรินิน โดยซิตรินินจัดเป็นสารพิษต่อการทำงานของไตในสัตว์ มีค่าปริมาณของสารพิษต่อน้ำหนักตัวที่สัตว์ทดลองได้รับเข้าไปแล้วทำให้สัตว์ทดลองตายเป็นจำนวนครั้งหนึ่ง (Median Lethal Dose, LD_{50}) เท่ากับ 35 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ข้าวแดงในรูปของสีผสมอาหารมีซิตรินินประมาณ 0.2 และ 1.7 ไมโครกรัมต่อกกรัม ดังนั้นความเข้มข้นของซิตรินินในผลิตภัณฑ์อาหารควรมีปริมาณที่น้อยที่สุด เช่น ประเทศญี่ปุ่นกำหนดปริมาณของซิตรินินที่สามารถปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ได้สูงสุด 200 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ประเทศไต้หวันกำหนดปริมาณของสารซิตรินินในผลิตภัณฑ์ข้าวแดง และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากเชื้อรา *Monascus* ให้มีความเข้มข้นของซิตรินินได้สูงสุด 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ นอกจากนี้ในปี ค.ศ. 2008 ประเทศจีนได้มีการออกมาตรฐานระดับชาติ (Chinese national standards, GB) 4926-2008 เกี่ยวกับผลิตภัณฑ์ข้าวแดงหรือโคจิ (ผง) เพื่อขอมาตรฐานคุณภาพที่เฉพาะของผลิตภัณฑ์ 3 ด้าน คือ ความต้องการทางด้านประสาทสัมผัส ดัชนีทางเคมีกายภาพ และด้านสุขภาพ แต่มาตรฐานนี้ยังไม่กำหนดปริมาณของสารซิตรินิน และนอกจากการควบคุมปริมาณซิตรินินในข้าวแดงจะต้องมีการควบคุมปริมาณสารอะฟลาทอกซินบี 1 (aflatoxin B1) โดยกำหนดให้มีความเข้มข้นไม่เกิน 5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดยปัจจุบันคณะกรรมการยุโรป (EU) ได้ออกระเบียบกำหนดชนิด และปริมาณสารปนเปื้อนในอาหาร เลขที่ 1881/2006 โดยกำหนดปริมาณสารซิตรินินที่ตกค้างสูงสุดในผลิตภัณฑ์อาหารไม่เกิน 2,000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (รุ่งลักษณ์ ประทุมชัย, 2559)

พาสตา

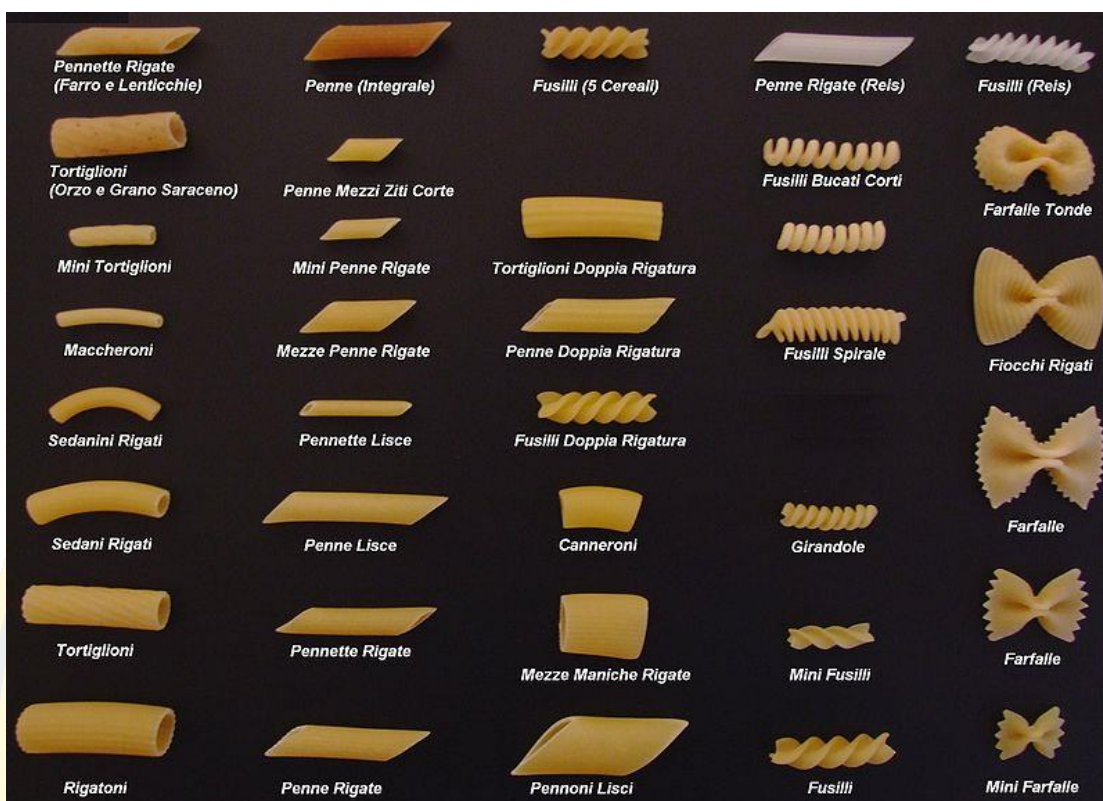
ผลิตภัณฑ์พาสตา (pasta) เป็นอาหารของชาวยุโรปที่เก่าแก่ที่สุดซึ่งทำมาจากเซโมลินาที่ได้จากการโม่ข้าวสาลีดูรัม ผ่านการผสมกับน้ำแล้วนวดให้เข้ากัน จึงอัดผ่านเครื่องด้วยความดันออกมาเป็นเส้นที่มีขนาด และรูปร่างต่าง ๆ กันไป ตามความนิยมของแต่ละท้องถิ่น และมีชื่อเรียกแตกต่างกันด้วย เช่น สปาเกตตี (spaghetti) มีลักษณะเส้นยาวเล็ก กลม และทึบ ส่วนมะกะโรนี (macaroni) มีเส้นขนาดใหญ่ มีรูกลวงตรงกลาง ยาวบ้าง สั้นบ้างหรืออาจโค้งงอ และราวีโอลิ (ravioli) จะมีลักษณะแผ่นแบน คล้ายแผ่นก๊วย เป็นต้น (ภาพที่ 2-12 และ 2-13) รูปแบบของพาสตา

ที่มีการจำหน่ายทั่วไป จะมีลักษณะแห้ง เนื่องจากเก็บรักษาง่าย ก่อนการบริโภคก็ต้องผ่านการต้มในน้ำเดือด แล้วจึงนำไปปรุงเป็นอาหารชนิดต่าง ๆ (รลิตา โอสถานนท์, 2558)



ภาพที่ 2-12 Pasta Lunga หรือ Long Pasta เป็นเส้นที่มีความยาวเกิน 10 เซนติเมตร

ที่มา: Unknown (2012)



ภาพที่ 2-13 Pasta Corta หรือ Short Pasta

ที่มา: Unknown (2012)

วัตถุดิบในการผลิตพาสตา

วัตถุดิบสำคัญในการผลิตพาสตา คือ เซโมลินา ซึ่งมีลักษณะเป็นเม็ดขนาดใหญ่กว่าแป้งมาก ในการโม่จึงต้องใช้วิธีเฉพาะเพื่อให้ได้เซโมลินาในปริมาณมากที่สุด และได้แป้งน้อยที่สุด การโม่ทำได้โดยการนำข้าวสาลีดูรัมมาปรับความชื้นภายในเนื้อเมล็ดเป็นร้อยละ 15 ส่วนเปลือกจะมีความชื้นร้อยละ 18 เพื่อให้การบดแยกเปลือก และคัพพะ ทำได้ง่าย และมีประสิทธิภาพ การแยกเปลือก และคัพพะทำโดยการผ่านเข้าเครื่องลมเป่าด้วยความเร็วสูง จากนั้นจึงผ่านเข้าเครื่องโม่ที่ประกอบด้วยชุดลูกกลิ้งบดแตกที่มีพื้นเลื่อย การโม่แบบนี้จะแยกคัพพะได้ยากกว่าการใช้ลูกกลิ้งผิวเรียบที่สามารถบดคัพพะให้เป็นแผ่นแบนแล้วร่อนแยกออกได้ง่าย ดังนั้น จำเป็นต้องแยกคัพพะออกให้ได้มากที่สุดในช่วงตอนแรก ระบบลูกกลิ้งแบบพื้นเลื่อยมีทั้งหมด 6-7 คู่ มีการบดแยกเป็นลำดับ ขณะเดียวกันก็มีระบบการร่อนคัดขนาด และเครื่องแยกคัพพะ และร้อออก จนได้เซโมลินาที่บริสุทธิ์ ระบบการโม่ที่ดีจะให้ปริมาณเซโมลินาร้อยละ 70 และมีแป้งปนเพียงร้อยละ 5-6 เท่านั้น (รลิตา อีสถานนท์, 2558)

ขนาดเซโมลินาที่ได้อยู่ในช่วง 200-380 ไมโครเมตร (ตารางที่ 2-5) ถ้ามีขนาดเล็กเกินไป จะมีผลเสียต่อการผลิตพาสตา เนื่องจากโปรตีนในแป้งจะเสียสภาพในขณะที่อัดเข้าเครื่องด้วยความดันที่มีความร้อนเกิดขึ้น แต่ถ้าเซโมลินามีขนาดใหญ่เกินไป การอุ้มน้ำของโดจะไม่ดีพอ การสุกของแป้งจะไม่สม่ำเสมอ และเกิดจุดดำในเส้นขณะทำแห้ง

สำหรับการตรวจสอบคุณภาพของเซโมลินา ควรตรวจสอบปริมาณการสกัด ปริมาณโปรตีน และเถ้า โดยเฉพาะปริมาณเอนไซม์ลิพอกซิเดส (lipoxidase) ต้องไม่มีหรือมีน้อยที่สุด เพราะเอนไซม์นี้จะไปทำลายสีเหลืองของพาสตาให้จางลง นอกจากนี้ควรตรวจสอบปริมาณจุลินทรีย์ เพื่อให้สามารถเก็บรักษาเซโมลินาได้นานด้วย (รลิตา โอสถานนท์, 2558)

ตารางที่ 2-5 ขนาดของเซโมลินาที่ใช้ผลิตพาสตาในทางการค้า

เบอร์ตะแกรง (US no.)	ขนาดรูตะแกรง (มิลลิเมตร)	ค้ำบนตะแกรงหรือลอดผ่าน	ปริมาณเซโมลินา (ร้อยละ)
20	0.86	ค้ำ	0
40	0.38	ค้ำ	22.8
60	0.23	ค้ำ	51.6
80	0.18	ค้ำ	14.6
100	0.14	ค้ำ	9.3
100	0.14	ผ่าน	1.7

ที่มา : รลิตา โอสถานนท์ (2558)

ขั้นตอนการผลิตพาสตา

ในการผลิตพาสตามีขั้นตอนหลัก 3 ขั้นตอน คือ การผสม การอัดด้วยความดันออกมาเป็นเส้น และการทำแห้ง ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

1. การผสม ผสมเซโมลินากับน้ำปริมาณร้อยละ 25-30 ที่อุณหภูมิ 32-38 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-15 นาที ได้โดที่เหนียวเหมาะสม หลังจากพักโดไว้ระยะหนึ่ง จึงนำโดมานวดในเครื่องนวดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ภายใต้สุญญากาศ เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดฟองอากาศขึ้นในโด ซึ่งจะมีผลให้เส้นพาสตาเป็นจุดดำ สีไม่สวย เนื่องจากอากาศช่วยเร่งการทำงานของเอนไซม์ลิพอกซิเดส ซึ่งจะทำลายเม็ดสีกลุ่มแคโรทีนอยด์ ทำให้พาสตามีสีอ่อนลง นอกจากนี้การมีฟองอากาศยังทำให้เส้นเปราะแตกหักง่ายด้วย

2. การอัดเป็นเส้น เป็นการนำโคที่นวดจนเรียบเนียนดีแล้วมาเข้าเครื่องเอกซ์ทรูเดอร์ โดยอาศัยแรงอัดของเครื่องซึ่งเกิดจากความดันที่ระดับต่างกันตามความเหมาะสม เพื่อให้ได้รูปแบบตามต้องการ โดบปกติจะใช้แรงดันประมาณ 1100-1850 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว หรือ 80-135 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร อุณหภูมิที่ใช้ไม่จำเป็นต้องสูง เนื่องจากไม่ต้องมีการพองตัวของผลิตภัณฑ์ อุณหภูมิที่ใช้ประมาณ 45 องศาเซลเซียส ก็เพียงพอแล้ว ตัวที่กำหนดรูปแบบของเส้นพาสตา คือ หน้าแปลน (die) ตามภาพที่ 2-14



ภาพที่ 2-14 หน้าแปลน (die) ของเครื่องเอกซ์ทรูเดอร์สำหรับการผลิตพาสตา
ที่มา: มหาวิทยาลัยหอการค้าไทย (2561)

3. การทำแห้ง เป็นขั้นตอนที่สำคัญมากต่อคุณภาพในการคืนตัวก่อนการบริโภค ซึ่งปัจจุบันมีระบบการทำแห้งที่ทันสมัย สามารถควบคุมอุณหภูมิ และความชื้นสัมพัทธ์ได้ ทำให้การทำแห้งมีลำดับขั้นตอนที่ค่อย ๆ ลดความชื้นจากเริ่มต้นร้อยละ 30 จนเหลือร้อยละ 12.5 โดยคงลักษณะคุณภาพของเส้นพาสตาที่ดีไว้ได้ (รลิตา ไอศถานนท์, 2558)

การทำแห้ง 3 ขั้นตอน คือ การทำแห้งขั้นต้น (pre drying) มีการควบคุมอุณหภูมิ 55-90 องศาเซลเซียส หมุนเวียนไป สามารถลดความชื้นภายในเส้นให้เหลือร้อยละ 17-18 ภายใน 1 ชั่วโมง จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอนที่ 2 คือ การกระจายความชื้น (sweating) เป็นการพักผลิตภัณฑ์ไว้ภายในห้องที่มีความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 90 นาน 2-4 ชั่วโมง เพื่อให้ความชื้นภายในเส้นกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอทั้งทั้งเส้น ในขั้นตอนสุดท้าย คือ การทำแห้ง (drying) โดยการควบคุมลมร้อนที่ไหลเวียนให้มีอุณหภูมิ 45-70 องศาเซลเซียส เพื่อให้ความชื้นค่อย ๆ ระเหยออกมาช้า ๆ และสม่ำเสมอ จึงใช้เวลานาน 10-16 ชั่วโมง ในที่สุดจะได้เส้นพาสตาที่แห้ง และมีคุณภาพดี

ในปัจจุบันมีการนำวิธีการที่ทันสมัยในการทำแห้งมาใช้ คือ ระบบไมโครเวฟ ซึ่งเป็นวิธีที่ช่วยลดต้นทุนการผลิต กล่าวคือ ประหยัดเวลา และพื้นที่ในการอบได้มาก อีกทั้งยังช่วย

ปรับปรุงคุณภาพของเส้นพาสตา ในด้านการหุงต้ม สี และช่วยลดปริมาณจุลินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (รลิตา โอสถานนท์, 2558)

การตรวจสอบคุณภาพของพาสตา

เป็นที่ทราบแล้วว่า พาสตาที่มีคุณภาพดีต้องมีสีเหลืองใส ไม่มีรอยแตกร้าว คงรูปร่าง ในขณะที่บรรจุ และขนส่ง และเมื่อนำมาต้มยังมีความคงตัว ไม่แตกหรือละ และดูดซึมน้ำได้ดี ผิวของเส้นต้องไม่เหนียวเหนอะ น้ำที่ต้มต้องไม่มีสสารขหรือมีน้อยมาก และพาสตาต้องทนต่อการต้มได้ดี สรุปวิธีการตรวจสอบพาสตาโดยการทำเป็นสปาเกตตี (รลิตา โอสถานนท์, 2558) มีดังนี้

1. การผลิตสปาเกตตี ชั่งเซโมลินา 1,600 กรัม ผสมน้ำให้เกิดโดที่มีความชื้นร้อยละ 31.5 ผ่านเข้าเครื่องอัดเป็นเส้นสปาเกตตี ทำแห้งที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เครื่องมือที่ใช้เป็นแบบมาตรฐานสำหรับห้องปฏิบัติการ
2. การวัดสี ใช้เครื่องวัดสี วัดค่าสีของเส้นเปรียบเทียบกับสีค่าเป็นพื้น อ่านค่าได้ 0-12 ค่า ยิ่งสูงยิ่งมีสีเหลืองสวย
3. น้ำหนักหลังการต้ม นำเส้นสปาเกตตี 10 กรัม ต้มในน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร จนเดือดเป็นเวลา 12 นาที สะเด็ดน้ำ แล้วชั่งน้ำหนักของเส้นหลังต้มเป็นกรัม
4. น้ำหนักที่หายไปในการต้ม เป็นปริมาณของแข็งจากการระเหยน้ำที่ใช้ต้มสปาเกตตี คิดเป็นร้อยละของน้ำหนักแห้งของสปาเกตตี
5. ความคงทนต่อการต้ม โดยวัดแรงเฉือน (shear) มีหน่วยเป็นกรัมต่อเซนติเมตร

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากงานวิจัยของ กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์ และสมจิตต์ ปาสะภาส (2551) ได้ศึกษาการหมักข้าวเหนียวดำของเชื้อรา *A. oryzae* TISTR 3256 และ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 โดยนำข้าวเหนียวดำนึ่งสุกที่มีความชื้นร้อยละ 75 นำสารแขวนลอยสปอร์ราที่เตรียมไว้ ซึ่ง *A. oryzae* TISTR 3256 และ *A. rouxii* TISTR 3182 มีความเข้มข้นของสารแขวนลอยสปอร์เท่ากับ 1×10^6 และ 1×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นเติมน้ำที่ฆ่าเชื้อแล้วในอัตราส่วนข้าว 1 ส่วนต่อน้ำ 3 ส่วน ทำการหมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า สายพันธุ์ *A. rouxii* TISTR 3182 สามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ได้สูงกว่าสายพันธุ์ *A. oryzae* TISTR 3256 Satora et al. (2018) ได้ศึกษาผลของสายพันธุ์ยีสต์ *S. cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces paradoxus* และสายพันธุ์ *Schizosaccharomyces pombe* ต่อองค์ประกอบทางเคมี และลักษณะทางประสาทสัมผัสของไวน์แอปเปิล โดยนำน้ำแอปเปิลมาเติมน้ำตาลซูโครสเพื่อให้มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด

เท่ากับ 22 องศาบริกซ์ ทำการหมักในขวดรูปชมพู่ขนาด 3 ลิตร โดยมีน้ำหมักแอปเปิลปริมาตร 1.5 ลิตร แล้วเติมเชื้อยีสต์ที่ความเข้มข้น 0.6 กรัม/น้ำหนักแห้งต่อลิตร ดำเนินการหมักที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน แล้วทำการถ่ายไวน์ใส่ขวดแล้วเก็บที่ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่า ยีสต์แต่ละสายพันธุ์มีการใช้ และสามารถผลิตเอทานอลได้ในปริมาณที่แตกต่างกัน อย่างไม่มีนัยสำคัญ โดยปริมาณเอทานอลอยู่ในช่วงร้อยละ 11.1-11.8 (ปริมาตรต่อปริมาตร) แต่เมื่อยีสต์ที่ใช้หมักแตกต่างกันไวน์แอปเปิลจะปริมาณสารระเหยแต่ละชนิดแตกต่างกัน เช่น อะซีทัลดีไฮด์ อะซิโตน สารประกอบคาร์บอนิล เอทิลอะซิเตท ไอโซเอมิลอะซิเตท เอทิลแคปโรเอท และ สารระเหยเอสเทอร์ เป็นต้น และ Wongpiyachon et al. (2008) ได้ศึกษาสายพันธุ์เชื้อรา *A. oryzae* และสายพันธุ์ยีสต์ *S. cerevisiae* ต่อคุณภาพของไวน์ข้าว โดยนำเชื้อรา *A. oryzae* มาเลี้ยงบนข้าวเพื่อเตรียมโคจิจากนั้นนำโคจิจที่ได้ และเชื้อยีสต์มาเตรียมเป็นก้ำเชื้อ ทำการหมักโดยแบ่งทยอยเติมข้าวสุก โคจิจ และน้ำเป็น 4 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกันเป็นระยะเวลา 1 วัน ทำการหมักที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 28 วัน จากนั้นนำไวน์ที่ได้มากรองแล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ พบว่า ยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* TISTR 5003, TISTR 5039, TISTR 5055, TISTR 5094, TISTR 5161, TISTR 5169, TISTR 5196, TISTR 5197, TISTR 5278 และ Kyo-kai สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้เท่ากับร้อยละ 10.73, 11.70, 10.26, 11.04, 11.18, 12.16, 12.40, 12.55, 9.27 และ 11.80 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ตามลำดับ ซึ่งยีสต์แต่ละสายพันธุ์สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้ในปริมาณที่แตกต่างกัน โดยยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* TISTR 5169, TISTR 5196 และ TISTR 5197 สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้ค่อนข้างสูง นอกจากนี้ Phuapai boon, (2017) ได้ศึกษาการหมักน้ำส้มสายชูจากข้าวชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ข้าวหอมนิล ข้าวไรซ์เบอร์รี่ และข้าวหอมแดง โดยหมักด้วย *Acetobacter pasteurianus* TISTR 102 โดยนำแป้งข้าว 120 กรัม เติมน้ำ 700 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 1000 มิลลิลิตร ทำการย่อยด้วยเอนไซม์อัลฟา-อะไมเลส และกลูโคสฟอสฟอไรเลส จากนั้นเติมน้ำยีสต์แห้ง 0.7 กรัม และข้าวแดง 4.8 กรัม ทำการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนได้ปริมาณแอลกอฮอล์เท่ากับร้อยละ 8 (ปริมาตรต่อปริมาตร) แล้วเติมโพแทสเซียมเมแทไบซัลไฟต์ 200 มิลลิกรัมในส่วนในล้านส่วน และก้ำเชื้อ *A. pasteurianus* TISTR 102 ปริมาตรร้อยละ 15 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ทำการหมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 13 วัน พบว่า วัตถุประสงค์ที่ใช้ในการหมักแตกต่างกันจะมีการแปรผันปริมาณกรดอะซิติกอยู่ในช่วงร้อยละ 2.6-3.3 เมื่อผ่านการหมักเป็นเวลา 12 วัน

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา

1. *A. rouxii* TISTR 3182
2. *M. purpureus* TISTR 3629
3. *S. cerevisiae* TISTR 5169, TISTR 5196, TISTR 5197
4. *A. pasteurianus* TISTR 102

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษาทั้งหมดซื้อจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

วัตถุดิบ

1. ผลพลอยได้จากการผลิตพาสตาข้าวเจ้า (ชัณนาท) ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทแฟมิลี่ ทรี ฟู้ดส์ จำกัด โดยผลพลอยได้จากการผลิตพาสตาข้าวเจ้าได้จากขั้นตอนการอัดขึ้นรูป (extrusion) เป็นเส้นพาสตา ซึ่งเป็นเส้นพาสตาที่ขึ้นรูปแล้วไม่ได้มาตรฐานมีรอยแตกที่ผิวของเส้นพาสตา จากนั้นนำมาบดให้เป็นผง รับประทานมาในครั้งเดียวกัน เก็บใส่ถุงพลาสติกชนิดปิดปากถุงแล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง

2. ข้าวเส้าให้ (TESCO)

อาหารที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อ

1. Potato Dextrose Broth (PDB, HIMEDIA, India)
2. Potato Dextrose Agar (PDA, HIMEDIA, India)
3. Yeast and Mold Broth (YMB, HIMEDIA, India)
4. Yeast and Mold Agar (YMA, HIMEDIA, India)
5. Glucose Yeast Extract Broth (GYEB, HIMEDIA, India)
6. Glucose Yeast Extract Agar (GYEA, HIMEDIA, India)
7. Compact dry YM (NISSUI pharma, Japan)

สารเคมีที่ใช้ทดสอบ

1. Sodium chloride (PubChem, U.S.)
2. Glycerol (PubChem, U.S.)
3. Methionine (HIMEDIA, India)
4. Sodium nitrate (PubChem, U.S.)
5. Folin-Ciocalteu's phenol reagent (LOBA Chemie, India)
6. Sodium carbonate (Ajax Finechem, Australia)
7. Gallic acid (SIGMA-ALORICH, USA)
8. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH, SIGMA-ALORICH, USA)
9. Methanol (RCI LABSCAN LIMITED, Thailand)
10. Potassium dihydrogen orthophosphate (Ajax Finechem, Australia)
11. Sodium phosphate dibasic (LOBA Chemie, India)
12. Xanthine (SIGMA-ALORICH, USA)
13. Allopurinol (SIGMA-ALORICH, USA)
14. Sodium hydroxide (Ajax Finechem, Australia)
15. Xanthine Oxidase (SIGMA-ALORICH, USA)
16. Ethanol (RCI LABSCAN LIMITED, Thailand)
17. Phenolphthalein (Ajax Finechem, Australia)
18. 3,5-Dinitrosalicylic acid (SIGMA-ALORICH, USA)
19. D-Glucose (Ajax Finechem, Australia)

เครื่องมือ

1. Autoclave (รุ่น H-99LL ตรา KOKUSAN ประเทศญี่ปุ่น)
2. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (รุ่น Model 100-800 ตรา Memmert ประเทศเยอรมนี)
3. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) (รุ่น Model BE600 ตรา Memmert ประเทศเยอรมนี)
4. เครื่องชั่งละเอียด (รุ่น BSA2245-CW ตรา Sartorius ประเทศเยอรมนี)
5. เครื่องชั่งหยาบ (รุ่น BSA32025-CW ตรา Sartorius ประเทศเยอรมนี)
6. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) (รุ่น Genesvs 20 ตรา Thermo Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา)
7. Shaker (รุ่น Innova 2050 ตรา New Brunswick scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา)

8. Hemacytometer (ตรา Blau Brand ประเทศเยอรมนี)
9. เครื่อง pH (รุ่น C860 ตรา Consort ประเทศเบลเยียม)
10. Hand refractometer (รุ่น MASTER-M ตรา ATAGO ประเทศญี่ปุ่น)

อุปกรณ์อื่นๆ

1. งานเพาะเลี้ยงเชื้อ
2. แท่งแก้วสามเหลี่ยม
3. ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร
4. ขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร
5. บีกเกอร์
6. ขวดปรับปริมาตร
7. ขวดรูปชมพู่ขนาด 2000 มิลลิลิตร
8. ขวดคูเรนขนาด 2000 มิลลิลิตร

วิธีดำเนินการทดลอง

1. การวิเคราะห์หองค์ประกอบทางเคมีพื้นฐานของผลพลอยได้พาสตาข้าวเจ้า
นำผลพลอยได้พาสตาข้าวเจ้าที่ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทแฟมิลี ทรี ฟู้ดส์ จำกัด มาวิเคราะห์หองค์ประกอบทางเคมีพื้นฐาน ได้แก่ ความชื้น เถ้า ไขมัน โปรตีน และคาร์โบไฮเดรต (AOAC, 2016)
2. การเตรียมกล้าเชื้อ
 1. การเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา
เตรียมสารแขวนลอยสปอร์โดยเริ่มจากการเพาะ *A. rouxii* TISTR 3182 และ *M. purpureus* TISTR 3629 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 (Montiel-González, Fernández, Keer, & Tomasini, 2009) และ 12 วัน (Suraiya et al., 2018) ตามลำดับ จากนั้นเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ด้วยการทดสอบละลายเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 10 มิลลิลิตร ลงในงานเพาะเลี้ยงเชื้อ ทำการขูดสปอร์ โดยแท่งแก้วสามเหลี่ยม วัดความเข้มข้นของสารแขวนลอยสปอร์ด้วย Haemacytometer สามารถทำได้โดยดูดสารแขวนลอยสปอร์ที่ได้ใส่ Haemacytometer ทั้งซ้าย และขวาด้านละ 10 ไมโครลิตร ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ นับสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่า โดยทำการนับจำนวน

สปอร์ 5 ช่อง ได้แก่ ช่องมุมด้านบนซ้าย และขวา ช่องมุมล่างซ้าย และขวา และช่องตรงกลาง
คำนวณสปอร์จากสูตร

ความเข้มข้นของสารแขวนลอยสปอร์ (สปอร์ต่อมิลลิลิตร) = ค่าเฉลี่ยของจำนวนสปอร์ที่นับได้ 5
ช่อง $\times 5 \times 10^4$

หากจำนวนสปอร์มีความเข้มข้นมากเกินไปให้ทำการเจือจางด้วยสารละลายน้ำเกลือ
หรือหากจำนวนสปอร์มีความเข้มข้นน้อยเกินไปให้ชุดสารแขวนลอยสปอร์เพิ่มแล้วนับจำนวน
สปอร์อีกครั้ง โดยความเข้มข้นของ *A. rouxii* TISTR 3182 ที่ใช้เป็นหัวเชื้อคือเท่ากับ 1×10^6 สปอร์
ต่อมิลลิลิตร (Montiel-González et al., 2009) และสำหรับ *M. purpureus* TISTR 3629 เท่ากับ 1×10^7
สปอร์ต่อมิลลิลิตร (Jirasatid et al., 2013)

2. การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์

ทำการเพาะ *S. cerevisiae* TISTR 5169, TISTR 5196 หรือ TISTR 5197 บนอาหาร
เลี้ยงเชื้อ YMA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเจือเชื้อลงในอาหาร YMB
ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วบ่มที่อุณหภูมิ
30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (เกศรินทร์ ไกลถิ่น, 2557) วัดความเข้มข้นของกล้าเชื้อยีสต์
ด้วย Haemocytometer เช่นเดียวกับการเตรียมสารละลายสปอร์ โดยความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์
เท่ากับ 1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ถูกใช้เป็นหัวเชื้อ (Dung, Rombouts, & Nout, 2006)

3. การเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติก

ทำการเพาะ *A. pasteurianus* TISTR 102 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ GYEA ที่อุณหภูมิ 30
องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเจือเชื้อลงในอาหาร GYEB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใน
ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24
ชั่วโมง (เกศรินทร์ ไกลถิ่น, 2557) เปรียบเทียบความเข้มข้นของกล้าเชื้อแบคทีเรียด้วย 1 McFarland
standard โดยมีความเข้มข้นเท่ากับ 3×10^8 จำนวนเซลล์แบคทีเรียที่แขวนลอยต่อมิลลิลิตร

3. การเตรียมโคจิ

1. การเตรียมโคจิผลพลอยได้พาสตาข้าวเจ้า

เตรียมโคจิผลพลอยได้พาสตาข้าวเจ้าโดยเริ่มจากซังผลพลอยได้พาสตาข้าวเจ้า 10
กรัม ใส่ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ จากนั้นเติมน้ำ 10 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้ความชื้นเริ่มต้นประมาณร้อยละ
50 ซึ่งเป็นสภาวะความชื้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *A. rouxii* (Dung, Rombouts, & Nout, 2005)
ทำการคลุกให้เข้ากัน แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งไว้ใน
เย็น จากนั้นเติมสารละลายสปอร์ของ *A. rouxii* TISTR 3182 ปริมาตรร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อ

น้ำหนักร้อยละ 1 มิลลิลิตร (Daroonpunt, Tanasupawat, & Keeratipibul, 2016) เกลี่ยสารละลายสปอร์ให้ทั่วอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน (ภาคผนวก ค)

2. การเตรียมโคจิจ้าวแดง

เตรียมโคจิจ้าวแดงโดยเริ่มจากการแช่ข้าวเสาไว้ในน้ำที่มากเกินไปเป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง เเทน้ำทิ้ง จากนั้นชั่งข้าว 30 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร แล้วเติม Nutrient broth ที่ประกอบไปด้วยกลีเซอรอลร้อยละ 2 (ปริมาตรต่อน้ำหนัก) เมทไทโอนีนร้อยละ 0.14 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) และโซเดียมไนเตรทร้อยละ 0.01 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ปริมาตร 7 มิลลิลิตร เพื่อปรับความชื้นของข้าวให้มีค่าประมาณร้อยละ 45 ทำการคลุกให้เข้ากัน แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็น จากนั้นเติมสารละลายสปอร์ของ *M. purpureus* TISTR 3629 ปริมาตรร้อยละ 5 (ปริมาตรต่อน้ำหนัก) หรือ 1.5 มิลลิลิตร เกลี่ยสารละลายสปอร์ให้ทั่วอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แล้วนำมาบดแบบหยาบ เก็บใส่ถุงออลูมิเนียมฟอยล์ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Jirasatid et al., 2013)

4. ศึกษาผลของสายพันธุ์ยีสต์ต่อคุณภาพของไวน์ข้าวแดงที่ผลิตจากผลพลอยได้พาสตาข้าวเจ้า

การทดลองนี้ออกแบบการทดลองแบบแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) โดยประกอบด้วยการทดลอง 3 สิ่งทดลอง โดยตัวแปรที่ศึกษา ได้แก่ สายพันธุ์ของยีสต์ คือ *S. cerevisiae* TISTR 5169, TISTR 5196 และ TISTR 5197 โดยทำการทดลอง 2 ซ้ำ

ขั้นตอนการหมักสามารถทำได้โดยเริ่มจากการเติมโคจิจ้าวแดงร้อยละ 1 ผสมกับโคจิจากผลพลอยได้พาสตาข้าวเจ้า 200 กรัม แล้วทำการเติมน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 800 กรัม และปรับปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดให้มีค่าประมาณ 25 องศาบริกซ์ ด้วยน้ำตาลทราย (Li, Lo, & Moon, 2014) แล้วใส่ตัวอย่าง 1000 มิลลิลิตรในขวดแก้วขนาด 2000 มิลลิลิตร จากนั้นเติมกล้าเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5169, TISTR 5196 หรือ TISTR 5197 ปริมาตรร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 14 วัน (กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์ และสมจิตต์ ปาสะภาส, 2551) ทำการวิเคราะห์ค่า pH (Hsieh, Lu, Lin, Lai, & Chiou, 2013) ปริมาณแอลกอฮอล์โดยใช้ Vinometer (Wendt, 2012) ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดโดยใช้ Hand refractometer (Li et al., 2014) และวิเคราะห์จำนวนยีสต์ และราโดยใช้วิธี Spread plate (Yousef & Carlstrom, 2003) ทุก ๆ 2 วัน ตลอดระยะเวลาการหมัก และวิเคราะห์ปริมาณประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Hsieh et al., 2013) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (Hsieh et al., 2013) ปริมาณโมโนโคลิน เค (Wang et al.,

2004) ปริมาณซิติรีนิน (Wang et al., 2014) ปริมาณรงควัตถุ ได้แก่ สีแดง สีส้ม และสีเหลือง (Johns & Stuart, 1991) และคุณภาพทางประสาทสัมผัสโดยทำการประเมินความเข้มข้น สีแดง ความขุ่น กลิ่นข้าว กลิ่นผลไม้ กลิ่นแอลกอฮอล์ รสหวาน รสเปรี้ยว รสขม และความฝาดด้วยวิธี Scoring test (ภาคผนวก ง) (Yang et al., 2018) เมื่อสิ้นสุดการหมัก

เกณฑ์ในการพิจารณา

เลือกตัวอย่างที่มีปริมาณแอลกอฮอล์สูงสุดในระยะเวลาสั้น แล้วมีคุณภาพทางประสาทสัมผัสสูงสุด และมีปริมาณโมนาโคลิค เกล็ด มีปริมาณซิติรีนินต่ำ

การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล (Analysis of Variance, ANOVA) การวิเคราะห์คุณภาพต่าง ๆ โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของคุณภาพที่วัดได้ โดยวิธี Tukey's Multiple Comparison Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป Minitab® 18

5. ศึกษาคุณภาพของน้ำส้มสายชูโคจิข้าวแดงที่ผลิตจากผลพลอยได้พาสตาข้าวเจ้า

ทำการหมักน้ำส้มสายชูโคจิข้าวแดงจากผลพลอยได้พาสตาข้าวเจ้าด้วยแบคทีเรียกรดอะซิติก *A. pasteurianus* TISTR 102 โดยทำการทดลอง 2 ชั้น

ขั้นตอนการหมักสามารถทำได้โดยเริ่มจากการนำไวน์ข้าวที่คัดเลือกได้จากข้อ 3 ที่ผ่านการแช่เย็นเพื่อให้ตกตะกอนแล้ว 1 สัปดาห์ มากรองด้วยผ้าขาวบาง 2 ชั้น ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นเจือจางตัวอย่างให้มีปริมาณแอลกอฮอล์ร้อยละ 6 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (Wu et al., 2018) และปรับให้มีปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติกร้อยละ 1.5 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ด้วยการเติมกรดอะซิติกเข้มข้น เพื่อปรับสภาวะให้เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียกรดอะซิติก (Wu et al., 2018) นำตัวอย่างปริมาตร 1000 มิลลิลิตรใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาดประมาณ 2000 มิลลิลิตร จากนั้นเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกของ *A. pasteurianus* TISTR 102 ปริมาตรร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง จนกว่าน้ำส้มสายชูจะมีปริมาณกรดอะซิติกไม่น้อยกว่าร้อยละ 4 (น้ำหนักต่อปริมาตร) (กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์ และสมจิตต์ ปาสะภาส, 2551) ทำการวิเคราะห์ค่า pH (Hsieh et al., 2013) ปริมาณแอลกอฮอล์โดยใช้ Vinometer (Wendt, 2012) ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดโดยใช้ Hand refractometer (Li, Lo, & Moon, 2014) จำนวนยีสต์ และราโดยใช้ Compact dry YM (Yousef & Carlstrom, 2003) จำนวนแบคทีเรีย

กรดอะซิติกโดยใช้วิธี Spread plate (Yousef & Carlstrom, 2003) และวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมด
ในรูปของกรดอะซิติก (AOAC, 2007) ทุก ๆ 3 วัน ตลอดระยะเวลาการหมัก (39 วัน) และวิเคราะห์
ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Hsieh et al., 2013) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH
(Hsieh et al., 2013) ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส (Hsieh et al., 2013) ปริมาณ โมนาโค
ลิน เอ (Wang et al., 2004) ปริมาณซิทรีนิน (Wang et al., 2014) และปริมาณรงควัตถุ ได้แก่ สีแดง สี
ส้ม และสีเหลือง (Johns & Stuart, 1991) เมื่อสิ้นสุดการหมัก

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล (Analysis of Variance, ANOVA) การวิเคราะห์
คุณภาพต่าง ๆ โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของ
คุณภาพที่วัดได้ โดยวิธี Tukey's Multiple Comparison Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยใช้
โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป Minitab® 18

บทที่ 4

ผลการทดลอง และวิจารณ์ผล

องค์ประกอบทางเคมีพื้นฐานของผลพลอยได้พาสตาข้าวเจ้า

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีพื้นฐานของผลพลอยได้พาสตาข้าวเจ้าดังตารางที่ 4-1 พบว่าองค์ประกอบหลักของผลพลอยได้พาสตาข้าวเจ้า คือ คาร์โบไฮเดรต ซึ่งมีปริมาณ 81.26% รองลงมาคือความชื้น โปรตีน เถ้า และไขมัน ซึ่งมีปริมาณ 10.65, 7.69, 0.35 และ 0.05% ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าองค์ประกอบทางเคมีของผลพลอยได้พาสตาข้าวเจ้ามีปริมาณใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Kahraman, Harsa, Lucisano, and Cappa (2018) ที่ได้รายงานไว้ว่า แป้งข้าวเจ้ามีปริมาณคาร์โบไฮเดรต ความชื้น โปรตีน เถ้า และไขมัน มีปริมาณเท่ากับ 77.9, 11.85, 8.29, 0.68 และ 1.28% ตามลำดับ

ตารางที่ 4-1 องค์ประกอบทางเคมีพื้นฐานของผลพลอยได้พาสตาข้าวเจ้า

องค์ประกอบทางเคมีพื้นฐาน	ผลพลอยได้พาสตาข้าวเจ้า
ความชื้น (ร้อยละของน้ำหนัก)	10.65±0.03
เถ้า (ร้อยละของน้ำหนักแห้ง)	0.35±0.00
ไขมัน (ร้อยละของน้ำหนักแห้ง)	0.05±0.00
โปรตีน (ร้อยละของน้ำหนักแห้ง)	7.69±0.32
คาร์โบไฮเดรต (ร้อยละของน้ำหนักแห้ง)	81.26±0.34

ศึกษาสายพันธุ์ยีสต์ต่อคุณภาพของไวน์โคจิจ้าวแดงที่ผลิตจากผลพลอยได้พาสตาข้าวเจ้า

1. จำนวนยีสต์ และรา

ตารางที่ 4-2 แสดงการเปลี่ยนแปลงจำนวนยีสต์ในไวน์โคจิจ้าวแดงที่หมักด้วย *S. cerevisiae* TISTR 5169 (S5169) , TISTR 5196 (S5196) และ TISTR 5197 (S5197) ผลการทดลองพบว่า ตัวอย่างไวน์โคจิจ้าวแดง S5169, S5196 และ S5197 มีจำนวนยีสต์เริ่มต้นเท่ากับ 6.89, 6.75 และ 6.85 log CFU/ml ตามลำดับ ($p>0.05$) และจำนวนยีสต์เพิ่มขึ้นจากวันที่ 0 ถึงวันที่ 2 หรือ 4 โดยตัวอย่าง S5169, S5196 และ S5197 มีจำนวนยีสต์สูงสุดเท่ากับ 7.64, 7.24 และ 7.21 log CFU/ml เมื่อหมักนาน 4, 2 และ 2 วัน ตามลำดับ มีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นประมาณ 0.75, 0.49 และ 0.36 log CFU/ml ตามลำดับ ผลการทดลองสามารถอธิบายได้ว่า ยีสต์สามารถเจริญเติบโตในผลพลอยได้

พาสตาข้าวเจ้า เนื่องจากผลพลอยได้พาสตาข้าวเจ้าอุดมไปด้วยแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของยีสต์ อย่างไรก็ตามยีสต์มีจำนวนเซลล์ลดลงในช่วงภายหลังการหมักนานประมาณ 6 วัน โดยทุกตัวอย่างมีจำนวนยีสต์น้อยกว่า 3 log CFU/ml ภายหลังจากการหมักนาน 14 วัน ซึ่งอาจเป็นผลมาจากสภาวะแวดล้อมในระหว่างการหมัก โดยแอลกอฮอล์ กรด และอุณหภูมิที่เพิ่มสูงขึ้นอาจยับยั้งการเจริญของยีสต์ (Liu, Wang, Sun, & Ni, 2020) ทั้งนี้ในระหว่างการหมักนั้นเมื่ออัตราการหมักแอลกอฮอล์เพิ่มสูงขึ้น จะส่งผลให้ความร้อนในระบบเพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งความร้อนที่เกิดขึ้นอาจมีผลต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ อีกทั้งความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ และปริมาณกรดที่เพิ่มขึ้นในระหว่างการหมักจะทำให้ยีสต์เกิดความเครียด ซึ่งส่งผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโต และอาจทำให้ยีสต์ตายในที่สุด (มะลิวัลย์ ชิวสุวรรณ, 2556) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Seo et al. (2016) ผู้ซึ่งทำการหมัก *Makgeolli* ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ไวน์ข้าวพื้นเมืองที่รู้จักกันอย่างแพร่หลายในเกาหลีเป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่า จำนวนยีสต์เริ่มต้นประมาณ 3.8 log CFU/ml และจำนวนยีสต์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในระหว่างการหมักจาก 0-5 วัน โดยในวันที่ 5 ของการหมักมีจำนวนยีสต์ประมาณ 5.1 log CFU/ml ซึ่งมีจำนวนเซลล์ยีสต์เพิ่มขึ้นประมาณ 1.3 log CFU/ml จากนั้นจำนวนยีสต์มีแนวโน้มลดลงจนวันสุดท้ายของการหมัก

ยีสต์แต่ละสายพันธุ์สามารถทนต่อสภาวะการหมักแอลกอฮอล์ เช่น อุณหภูมิ ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ และกรดอินทรีย์ที่แตกต่างกัน ซึ่งส่งผลต่อการรอดชีวิตของยีสต์ (มะลิวัลย์ ชิวสุวรรณ, 2556)

ตารางที่ 4-2 จำนวนยีสต์ในไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5169 (S5169), TISTR 5196 (S5196) และ TISTR 5197 (S5197)

ระยะเวลาในการหมัก	จำนวนยีสต์ของไวน์โคจิข้าวแดง (log CFU/ml)		
	S5169	S5196	S5197
0 ^{NS}	6.89±0.41 ^{ab}	6.75±0.49 ^{ab}	6.85±0.54 ^a
2 ^{NS}	7.19±0.67 ^a	7.24±0.73 ^a	7.21±0.74 ^a
4 ^{NS}	7.64±0.56 ^a	5.97±1.05 ^{ab}	7.02±0.39 ^a
6 ^{NS}	5.16±1.06 ^{bc}	6.02±0.06 ^{ab}	6.40±0.32 ^a
8 ^{NS}	4.67±0.03 ^{cd}	5.13±0.09 ^b	6.01±1.39 ^{ab}
10 ^{NS}	<3 ^d	5.28±0.08 ^b	5.80±1.31 ^{ab}
12	<3 ^d	<3 ^c	<3 ^b
14	<3 ^d	<3 ^c	<3 ^b

^{a, b, c, d} คือ ค่าเฉลี่ยในแถวแนวตั้งที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

^{NS} คือ ค่าเฉลี่ยในแถวอนที่มีแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

ตารางที่ 4-3 แสดงการเปลี่ยนแปลงจำนวนราในไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย *S. cerevisiae* TISTR 5169 (S5169), TISTR 5196 (S5196) และ TISTR 5197 (S5197) โดยราที่พบในไวน์โคจิข้าวแดงส่วนใหญ่เป็นรา *M. purpureus* ผลการทดลอง พบว่า ตัวอย่าง S5169, S5196 และ S5197 มีจำนวนราเริ่มต้นเท่ากับ 4.97, 5.61 และ 4.69 log CFU/ml ตามลำดับ ($p > 0.05$) และมีแนวโน้มค่อนข้างคงที่ตลอดระยะเวลาการหมัก โดยภายหลังการหมักตัวอย่าง S5169, S5196 และ S5197 มีจำนวนราเท่ากับ 4.29, 4.53 และ 4.82 log CFU/ml ตามลำดับ ($p > 0.05$) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ราสามารถรอดชีวิตได้ดีกว่ายีสต์ (*S. cerevisiae*) ในระหว่างการหมักแอลกอฮอล์ อาจเป็นผลมาจากราสามารถทนต่อแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้นสูงได้ดีกว่ายีสต์ (Cai et al., 2018) เนื่องจากรามีโครงสร้างผนังเซลล์เป็นเปลือกแข็งห่อหุ้ม ซึ่งประกอบด้วยสารหลายชนิดที่สำคัญ ได้แก่ ไคติน กลูแคน เซลลูโลส เป็นต้น โดยจะมีการจับเรียงตัวกันเป็นสายยาว และรวมกันเป็นมัดคล้ายสายเคเบิล เรียกว่า fibrillary components ซึ่งจะมีการเชื่อมต่อกันเป็นตาข่ายร่างแหเรียงซ้อนกันเป็นชั้น ๆ นอกจากนี้ยังมีสารพวกโปรตีน และน้ำตาลบางชนิดเรียงตัวกันอย่างไม่เป็นระเบียบจับกันเป็นชั้นเมือกใส ๆ หรือก้อนเมือกเยิ้มเป็นมัน เรียกว่า matrix component ฝั่งตัว หรือยึดเกาะกับตาข่ายร่างแห อีกทั้งรา *Monascus* sp. มีเส้นใยแบบมีผนังกัน (septate hyphae) ซึ่งมีช่องเปิดเพียง

ช่องเดี่ยว และมี woronin bodies ทำหน้าที่อุดช่องได้เมื่อเกิดอันตรายต่อเซลล์ (กิ่งจันทน์ มะลิซ้อน, 2557)

ตารางที่ 4-3 จำนวนราในไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5169 (S5169), TISTR 5196 (S5196) และ TISTR 5197 (S5197)

ระยะเวลาในการหมัก	จำนวนราของไวน์โคจิข้าวแดง (log CFU/ml)		
	S5169 ^{ns}	S5196 ^{ns}	S5197 ^{ns}
0 ^{NS}	4.97±0.21	5.61±0.27	4.69±0.24
2 ^{NS}	5.69±1.23	6.02±0.71	5.37±0.21
4 ^{NS}	5.17±0.49	5.42±0.28	5.18±0.93
6 ^{NS}	4.18±1.49	4.44±1.30	4.90±1.27
8 ^{NS}	3.80±1.14	4.13±1.84	5.02±0.71
10 ^{NS}	3.59±1.64	4.31±1.12	4.10±1.80
12 ^{NS}	4.36±0.31	4.80±0.30	5.23±0.27
14 ^{NS}	4.29±0.27	4.53±0.50	4.82±0.12

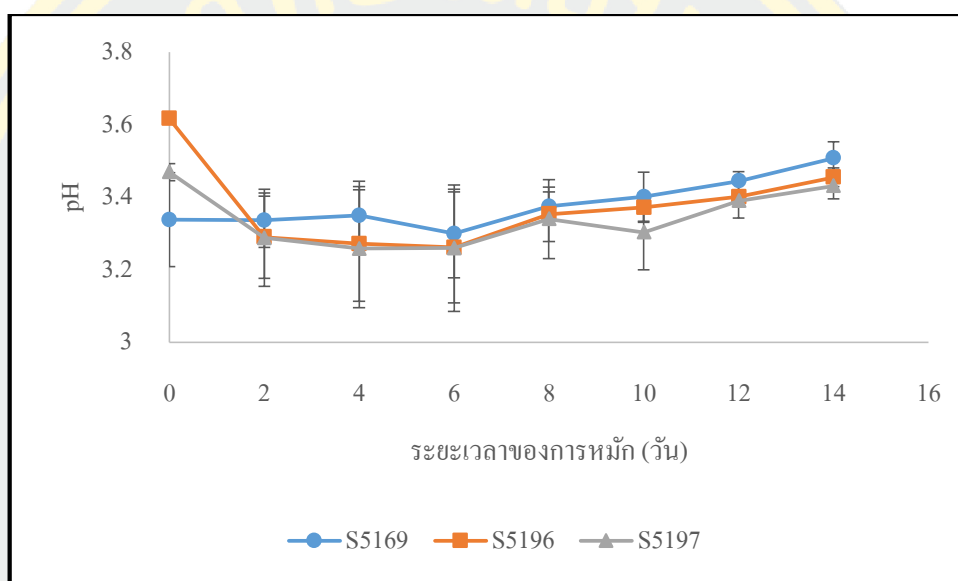
^{ns} คือ ค่าเฉลี่ยในแถวแนวนอนที่มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

^{NS} คือ ค่าเฉลี่ยในแถวแนวนอนที่มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

2. ค่า pH

ภาพที่ 4-1 แสดงการเปลี่ยนแปลงค่า pH ของไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย *S. cerevisiae* TISTR 5169 (S5169), TISTR 5196 (S5196) และ TISTR 5197 (S5197) พบว่า ตัวอย่าง S5169, S5196 และ S5197 มีค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 3.34, 3.62 และ 3.47 ตามลำดับ ($p>0.05$) และมีค่าลดลงจากวันที่ 0 ถึงวันที่ 4 หรือ 6 จากนั้นมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเล็กน้อยตลอดระยะเวลาการหมัก โดยเมื่อวันสุดท้ายของการหมักตัวอย่าง S5169, S5196 และ S5197 มีค่า pH เท่ากับ 3.51, 3.46 และ 3.43 ตามลำดับ ($p>0.05$) อย่างไรก็ตาม ค่า pH ของแต่ละตัวอย่างแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติตลอดระยะเวลาการหมัก ($p>0.05$) ทั้งนี้ค่า pH ที่ลดลงจากวันที่ 0 จนถึงวันที่ 4 หรือ 6 อาจเป็นผลมาจากการเพิ่มขึ้นของกรดอินทรีย์ เช่น กรดมาลิก และกรดซัคซินิก ที่สังเคราะห์จากวัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก (TCA cycle) เพื่อผลิตอะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (ATP) สำหรับเมแทบอลิซึมของเซลล์จุลินทรีย์ (Li et al., 2014) ขณะที่การเพิ่มขึ้นเล็กน้อยของค่า pH ในช่วงสุดท้ายของการหมักอาจเป็นผลมาจากการเพิ่มขึ้นของแอมโมเนีย ซึ่งถูกผลิตจากกระบวนการดีอะมิเนชัน

(Deamination) ซึ่งเป็นเมทาบอลิซึมหนึ่งของจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นปฏิกิริยาขจัดหมู่อะมิโน ทำให้หมู่อะมิโนของกรดอะมิโนต่าง ๆ สามารถถูกขจัดออกได้หมดในรูปของแอมโมเนีย และอาจจะเกิดปฏิกิริยาการโยกย้ายหมู่อะมิโนควบคู่กันไปทำให้หมู่อะมิโนของกรดอะมิโนเหล่านั้นถูกเปลี่ยนเป็นหมู่อะมิโนของกรดอะมิโนอื่นที่ต้องการ ซึ่งจากกระบวนการคิอะมิเนชันจะได้แอมโมเนียเป็นผลพลอยได้จากการแยกหมู่อะมิโนออกจากโมเลกุลของกรดอะมิโน และได้กรดไพรูวิก เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นใน TCA cycle (Khunsoontorn et al., 2015)

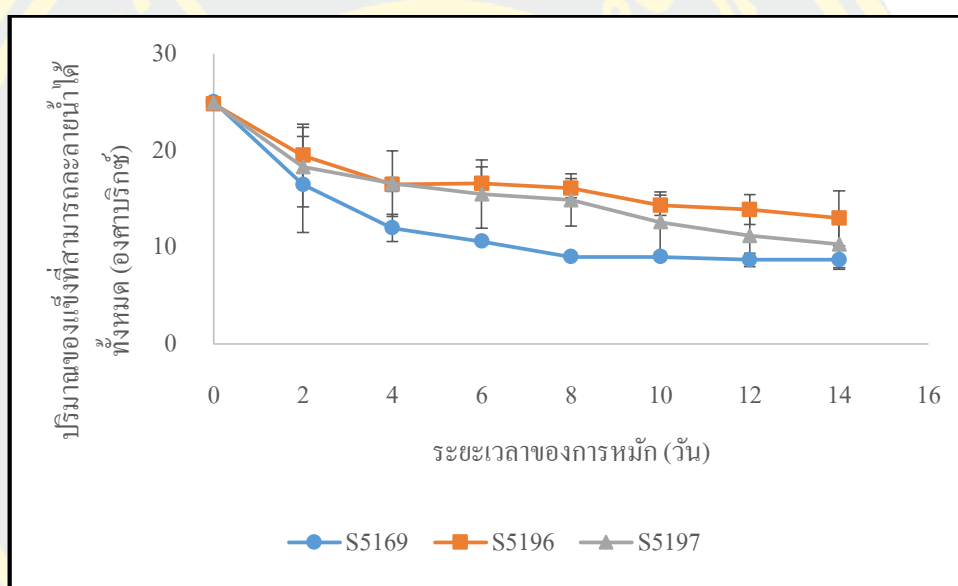


ภาพที่ 4-1 ค่า pH ของไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5169 (S5169), TISTR 5196 (S5196) และ TISTR 5197 (S5197)

3. ปริมาณของแข็งที่สามารถละลายน้ำได้ทั้งหมด

ภาพที่ 4-2 แสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณของแข็งที่สามารถละลายน้ำได้ทั้งหมดของไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย *S. cerevisiae* TISTR 5169 (S5169), TISTR 5196 (S5196) และ TISTR 5197 (S5197) พบว่า ตัวอย่าง S5169, S5196 และ S5197 มีปริมาณของแข็งที่สามารถละลายน้ำได้ทั้งหมดเริ่มต้นเท่ากับ 25.03, 24.83 และ 24.9 องศาบริกซ์ ตามลำดับ ($p > 0.05$) และมีแนวโน้มลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ตลอดระยะเวลาการหมัก โดยเมื่อวันสุดท้ายของการหมัก ตัวอย่าง S5169, S5196 และ S5197 มีปริมาณของแข็งที่สามารถละลายน้ำได้ทั้งหมดเท่ากับ 8.70, 13.00 และ 10.30 องศาบริกซ์ ตามลำดับ ($p > 0.05$) ในแต่ละวันของการหมักนั้นทุกตัวอย่างมีปริมาณของแข็งที่สามารถละลายน้ำได้ทั้งหมดแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ยกเว้นวันที่ 8 ของการหมัก ทั้งนี้องค์ประกอบหลักของแข็งที่สามารถละลายน้ำได้ในระบบการหมัก

แอลกอฮอล์ คือ สารอินทรีย์จำพวกน้ำตาล เช่น น้ำตาลกลูโคส เป็นต้น ซึ่งการลดลงของปริมาณของแข็งที่สามารถละลายน้ำได้ทั้งหมด เป็นผลมาจากยีสต์ และเราใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับเมแทบอลิซึมของเซลล์ และการเจริญเติบโต (Li et al., 2014) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Singkong (2015) ซึ่งทำการผลิตไวน์จากข้าวหอมนิล พบว่า ปริมาณของแข็งที่สามารถละลายน้ำได้ทั้งหมดมีแนวโน้มลดลงตลอดระยะเวลาของการหมัก โดยปริมาณของแข็งที่สามารถละลายน้ำได้ทั้งหมดเริ่มต้น 25 องศาบริกซ์ ลดลงเหลือ 14.7-15.4 องศาบริกซ์ ตามลำดับ เมื่อทำการหมักเป็นระยะเวลา 10 วัน

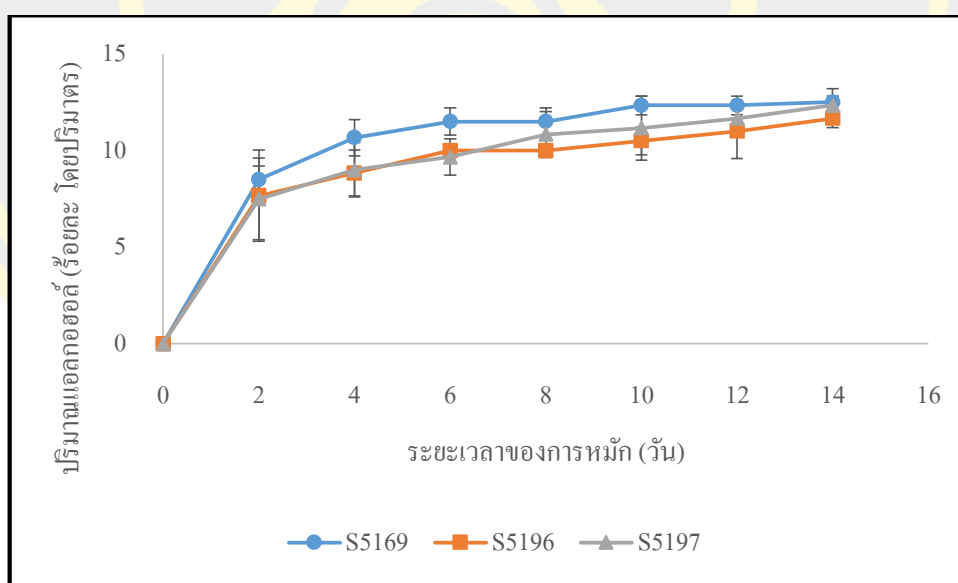


ภาพที่ 4-2 ปริมาณของแข็งที่สามารถละลายน้ำได้ทั้งหมดของไวน์ โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5169 (S5169), TISTR 5196 (S5196) และ TISTR 5197 (S5197)

4. ปริมาณแอลกอฮอล์

ภาพที่ 4-3 แสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณแอลกอฮอล์ของไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย *S. cerevisiae* TISTR 5169 (S5169), TISTR 5196 (S5196) และ TISTR 5197 (S5197) พบว่า ทุกตัวอย่างปริมาณแอลกอฮอล์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น จากวันที่ 0 ถึงวันที่ 14 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดง S5169, S5196 และ S5197 มีปริมาณแอลกอฮอล์ภายหลังการหมักเท่ากับร้อยละ 12.5, 11.67 และ 12.34 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ตามลำดับ ($p > 0.05$) ผลการทดลองสามารถอธิบายได้ว่ายีสต์ใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญ และผลิตเอทานอล ซึ่งเป็นสารเมแทบอลิต์ปฐมภูมิ (primary metabolite) พร้อมกับการเจริญของยีสต์ระหว่างการหมัก (Yang, Gu, & Gu, 2016) อย่างไรก็ตาม ยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* TISTR 5169 เป็นสายพันธุ์ที่

ผลิตแอลกอฮอล์ได้สูงกว่าสายพันธุ์อื่น โดยสามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้มากกว่าร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ภายในระยะเวลา 4 วัน ผลการทดลองแนะนำได้ว่า S5169 เป็นสายพันธุ์ที่สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้สูงในระยะเวลาสั้น ซึ่งเหมาะสำหรับการประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรม ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Singkong (2015) ซึ่งพบว่า ไวน์จากข้าวหอมนิลมีปริมาณแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการหมัก โดยตัวอย่างมีแอลกอฮอล์สูงกว่าร้อยละ 10 ในวันที่ 6 ของการหมัก และมีปริมาณแอลกอฮอล์ประมาณร้อยละ 12 หลังทำการหมักเป็นระยะเวลา 10 วัน นอกจากนี้งานวิจัยของ Jiang, Su, Mu, and Mu (2020) รายงานว่า ไวน์ข้าวเหนียวดำมีปริมาณแอลกอฮอล์สูงกว่าร้อยละ 10 ในวันที่ 4 ของการหมัก และไวน์ข้าวเหนียวดำมีปริมาณแอลกอฮอล์ประมาณร้อยละ 18 ภายหลังจากหมักนาน 24 วัน ทั้งนี้ประสิทธิภาพในการผลิตแอลกอฮอล์ของยีสต์แต่ละสายพันธุ์แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนในวัตถุดิบ สภาพในการหมัก และสายพันธุ์ของยีสต์ โดยยีสต์บางชนิดที่มีสารสเตอรอลส่วนใหญ่อยู่ในรูปของเออร์โกสเตอรอล และ zymosterol ในเชื้อหุ้มเซลล์ในปริมาณมากเป็นพิเศษจะมีส่วนช่วยทำให้ยีสต์ทนต่อแอลกอฮอล์ที่ระดับความเข้มข้นสูงได้ (กิ่งจันทน์ มะลิซ้อน, 2557)

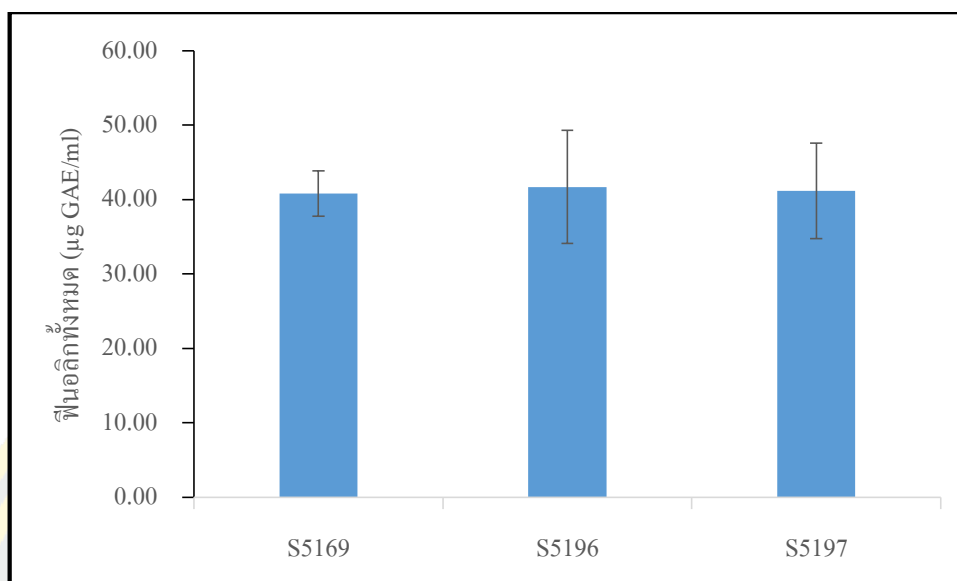


ภาพที่ 4-3 ปริมาณแอลกอฮอล์ของไวน์โคจิจ้าวแดงที่หมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5169 (S5169), TISTR 5196 (S5196) และ TISTR 5197 (S5197)

5. ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

ตัวอย่างไวน์โคจิจ้าวแดง S5169, S5196 และ S5197 ภายหลังจากหมักมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 40.79, 41.70 และ 41.16 $\mu\text{g GAE/ml}$ ตามลำดับ ซึ่งแตกต่าง

กันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) (ภาพที่ 4-4) ผลการทดลองสามารถอธิบายได้ว่า สารประกอบฟีนอลิกที่มีอยู่ในไวน์ข้าว อาจมาจากผลพลอยได้พาสตาข้าวเจ้า ซึ่งเป็นวัตถุดิบหลักที่ใช้ในการหมัก โดยจากงานวิจัยของ Tian, Nakamura, and Kayahara (2004) รายงานว่า ข้าวขาวมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเท่ากับ 0.28 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของแป้ง นอกจากนี้ข้าวแดงยังมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเท่ากับ 28 $\mu\text{g GAE/g DW}$ ซึ่งประกอบไปด้วยสารฟีนอลิก เช่น กรดไฮดรอกซีซินนามิก (hydroxycinnamic acid) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) กรดไฮดรอกซีเบนโซอิก (hydroxybenzoic acid) ควินาโซลีน โนน (quinazolinone) และควินาโซลีน (quinazoline) เป็นต้น (Elumalai, Park, Cho, Shea, & Oh, 2019) ทั้งนี้แต่ละตัวอย่างใช้ผลพลอยได้พาสตาข้าวเจ้า และโคจ ข้าวแดงในปริมาณที่เท่ากันเป็นผลให้มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดใกล้เคียงกัน เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่น พบว่า ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในไวน์โคจข้าวแดงจากงานวิจัยนี้ น้อยกว่า งานวิจัยของ Hsieh et al. (2013) ซึ่งพบว่า ไวน์โคจข้าวแดงมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดประมาณ 105 $\mu\text{g GAE/ml}$ นอกจากนี้ Chay et al. (2020) พบว่า ไวน์ข้าวเหนียว และไวน์ข้าวเหนียวดำที่หมักด้วยวิธีดั้งเดิม และแบบ Multi-parallel จากลูกแป้งท้องถิ่น และลูกแป้งที่พัฒนาใหม่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกแปรผันอยู่ระหว่าง 577.4-607.4 และ 478.6-503.6 $\mu\text{g GAE/ml}$ ตามลำดับ จากงานวิจัยของ Kim, Kim, Dhungana, Lee, and Shin (2015) ได้ทำการหมักไวน์ข้าว *Takju* ซึ่งเป็นเครื่องแอลกอฮอล์ดั้งเดิมของประเทศเกาหลี พบว่าไวน์ข้าว *Takju* มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด 78.51 $\mu\text{g GAE/ml}$ ทั้งนี้จากข้อมูลงานวิจัยข้างต้นปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่แตกต่างกันในผลิตภัณฑ์ไวน์ข้าวอาจเป็นผลมาจากวัตถุดิบที่ใช้ในการหมัก และกรรมวิธีในการหมัก

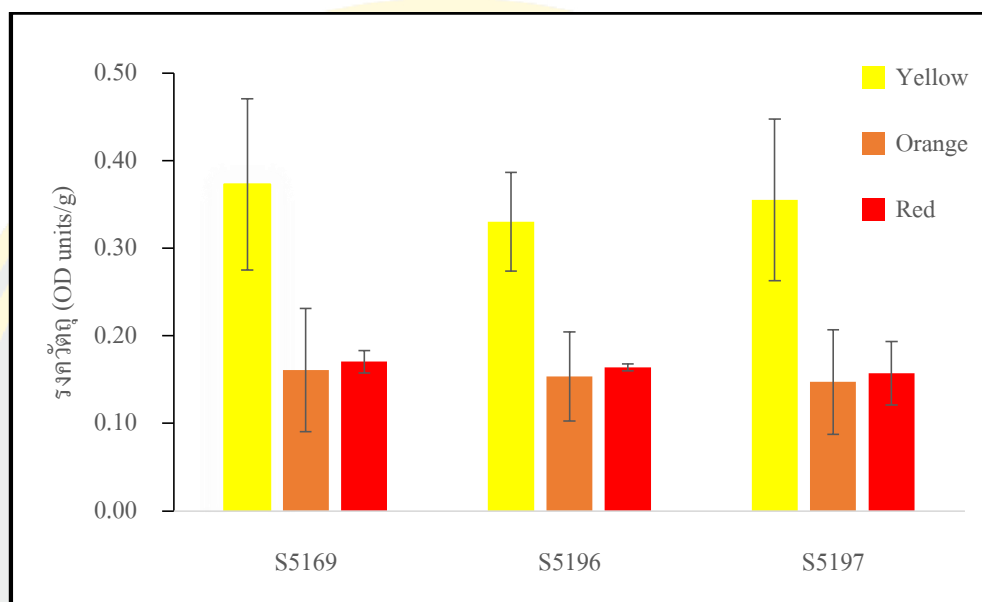


ภาพที่ 4-4 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5169 (S5169), TISTR 5196 (S5196) และ TISTR 5197 (S5197)

6. ปริมาณรงควัตถุสีเหลือง สีส้ม และสีแดง

ภาพที่ 4-5 แสดงปริมาณรงควัตถุสีเหลือง สีส้ม และสีแดงของไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักจากผลพลอยได้พาสต้าข้าวเจ้าด้วยยีสต์สายพันธุ์ต่าง ๆ ผลการทดลองพบว่า การเติมโคจิข้าวแดง (ร้อยละ 1) ทำให้ไวน์โคจิข้าวแดงมีรงควัตถุสีเหลือง สีส้ม และสีแดงของรา *M. purpureus* โดยทุกตัวอย่างมีรงควัตถุสีเหลืองแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกับรงควัตถุสีส้ม และสีแดง เมื่อภายหลังการหมักนาน 14 วัน ตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดง S5169, S5196 และ S5197 มีปริมาณรงควัตถุสีเหลือง เท่ากับ 0.37, 0.33 และ 0.36 OD units/g ($p > 0.05$) รงควัตถุสีส้ม เท่ากับ 0.16, 0.15 และ 0.15 OD units/g ($p > 0.05$) และรงควัตถุสีแดง เท่ากับ 0.17, 0.16 และ 0.16 OD units/g ($p > 0.05$) ตามลำดับ ทั้งนี้รงควัตถุที่พบในไวน์โคจิข้าวแดงมาจากโคจิข้าวแดง ซึ่งรา *M. purpureus* ผลิตรงควัตถุ 3 ชนิด ได้แก่ สีเหลือง สีส้ม และสีแดง โดยทุกตัวอย่างใช้ข้าวแดงในปริมาณที่เท่ากัน (ร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก) ดังนั้นจึงทำให้ไวน์โคจิข้าวแดงมีปริมาณรงควัตถุสีเหลือง สีส้ม และสีแดงที่ใกล้เคียงกัน ทั้งนี้รา *M. purpureus* TISTR 3629 ให้รงควัตถุสีเหลืองปริมาณมากกว่าสีแดง และสีส้ม ทำให้ไวน์โคจิข้าวแดงปรากฏรงควัตถุสีเหลืองมากที่สุด รา *Monascus* ผลิตรงควัตถุ 3 ชนิด ประกอบด้วยรงควัตถุ 6 ชนิด ได้แก่ โมนาสซิน และอังกักฟลาวินเป็นรงควัตถุสีเหลือง รูโบรฟังกาทิน และโมนาสโครูบรินเป็นรงควัตถุสีส้ม และรูโบรฟังกาทิน และโมนาสโครูบรินเป็นรงควัตถุสีแดง รงควัตถุจากรา *Monascus* เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยโมนาสซิน อังกักฟลาวิน รูโบรฟังกาทิน รูโบรฟังกาทิน และโมนาสโครูบรินมีฤทธิ์ต้านมะเร็ง รงควัตถุสีส้ม (รูโบรฟังกาทิน

ทิน และโมนาสโครบริน) มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ รงควัตถุสีแดง และสีส้มยังสามารถต้านจุลินทรีย์ก่อโรคบางชนิด นอกจากนี้โมนาสซินยังมีฤทธิ์ต้านทานโรคอ้วน และเบาหวาน โดยลดการสะสมของไตรกลีเซอไรด์ (Srianta, Zubaidah, Estiasih, Yamada, & Harijono, 2016)



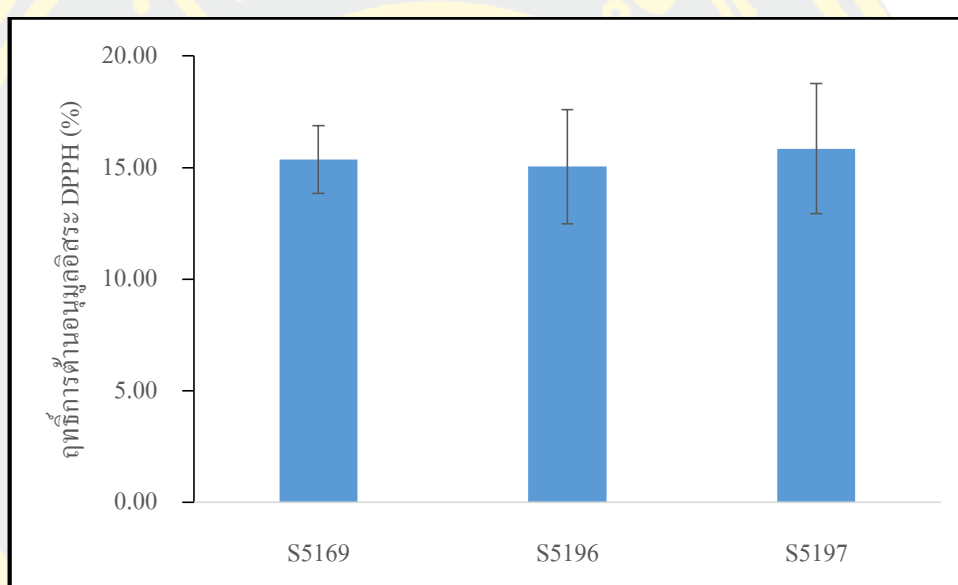
ภาพที่ 4-5 ปริมาณสารรงควัตถุสีเหลือง สีส้ม และสีแดงของไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5169 (S5169), TISTR 5196 (S5196) และ TISTR 5197 (S5197)

7. ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

ภาพที่ 4-6 แสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของไวน์โคจิข้าวแดงที่ผลิตจากผลพลอยได้พาสตาข้าวเจ้าโดยหมักด้วยยีสต์สายพันธุ์ต่าง ๆ พบว่า ภายหลังจากหมักนาน 14 วัน ตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดง S5169, S5196 และ S5197 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับร้อยละ 15.36, 15.04 และ 15.84 ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ทั้งนี้สามารถอธิบายได้ว่า ตัวอย่างไวน์ข้าวแดงทุกตัวอย่างมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณรงควัตถุที่มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระใกล้เคียงกัน จึงเป็นผลให้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างไวน์ข้าวแดงทุกตัวอย่างแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ

จากงานวิจัยของ Chay et al. (2020) ได้ทำการหมักไวน์ข้าวเหนียว และไวน์ข้าวเหนียวดำ พบว่า ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH สัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารฟีนอลิกทั้งหมดในตัวอย่าง โดยไวน์ข้าวเหนียวดำมีฟีนอลิกทั้งหมด (25 μg GAE/ml) สูงกว่าไวน์ข้าวเหนียว ทำให้มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงกว่าเช่นเดียวกัน โดยตัวอย่างที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุด คือ ไวน์ข้าวเหนียวดำที่หมักด้วยวิธีดั้งเดิม และมีสารฟีนอลิกทั้งหมด 25 μg

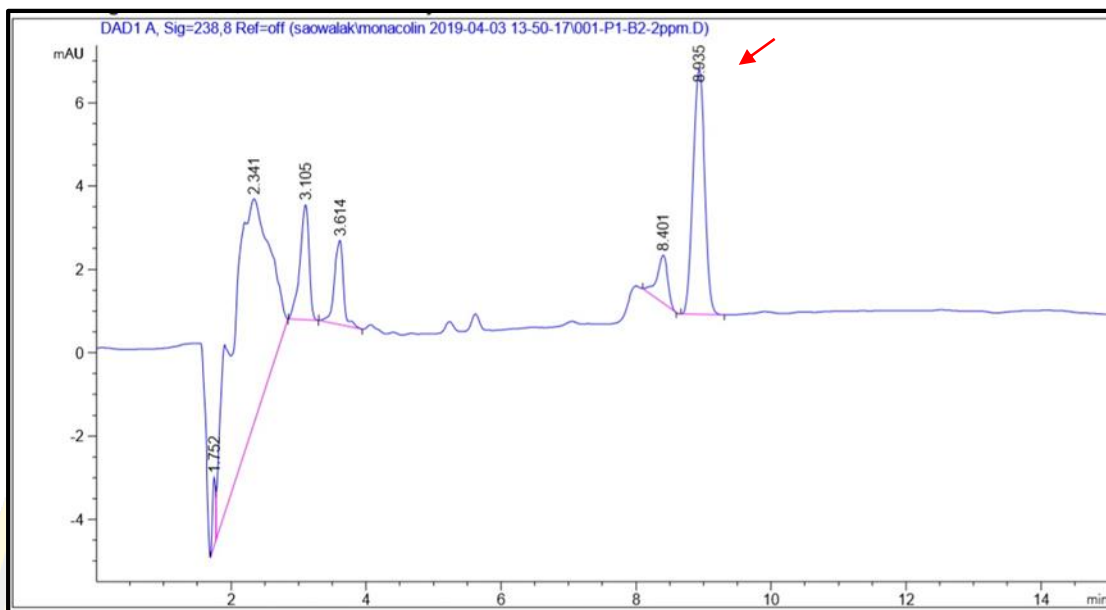
GAE/ml ซึ่งมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับร้อยละ 32.75 และชนิดของลูกแบ่งไม่มีผลต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH นอกจากนี้ Yang et al. (2019) ได้ทำการหมักไวน์ข้าวแล้วเติมผงราก *Polygonum cuspidatum* พบว่า ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณผงราก *P. cuspidatum* ในตัวอย่าง โดยตัวอย่างควบคุมมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับร้อยละ 5.12 และมีค่าเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 37.18 เมื่อเติมผงราก *P. cuspidatum* ปริมาณร้อยละ 5 ทั้งนี้จากข้อมูลงานวิจัยข้างต้นสามารถสรุปได้ว่า จากวัตถุดิบที่ใช้ในการหมักมีอิทธิพลสำคัญต่อปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสัมพันธ์ต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในไวน์



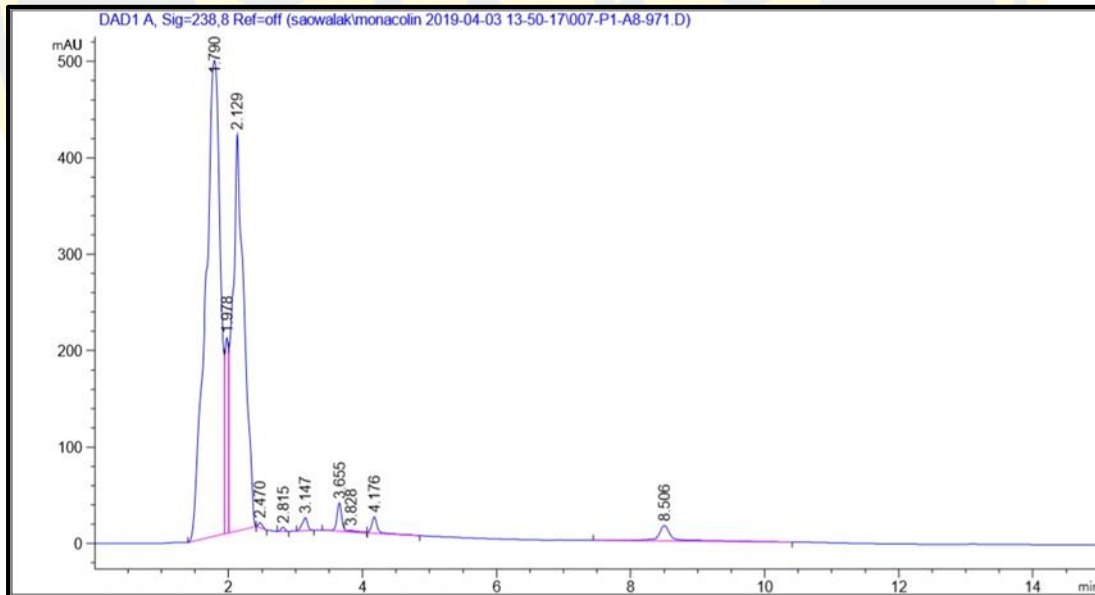
ภาพที่ 4-6 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5169 (S5169), TISTR 5196 (S5196) และ TISTR 5197 (S5197)

8. ปริมาณสารโมนาโคลิน เค

ภาพที่ 4-7 แสดงกราฟโครมาโทแกรมของโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงของสารมาตรฐานโมนาโคลิน เค ความเข้มข้น 2 หนึ่งในล้านส่วน พบว่า สารมาตรฐานโมนาโคลิน เค ออกมาในเวลา 8.935 นาที และเมื่อเปรียบเทียบกับกราฟโครมาโทแกรมของโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงของตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดงทุกตัวอย่างไม่พบสารโมนาโคลิน เค ตัวอย่างเช่นภาพที่ 4-8 แสดงกราฟโครมาโทแกรมของโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงของตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย *S. cerevisiae* TISTR 5197 (S5197) ผลการทดลองสามารถอธิบายได้ว่า งานวิจัยนี้ใช้โคจิข้าวแดงเป็นวัตถุดิบในการหมักน้อย (ร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก) จึงทำให้ไม่พบสารโมนาโคลิน เค ในตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดง



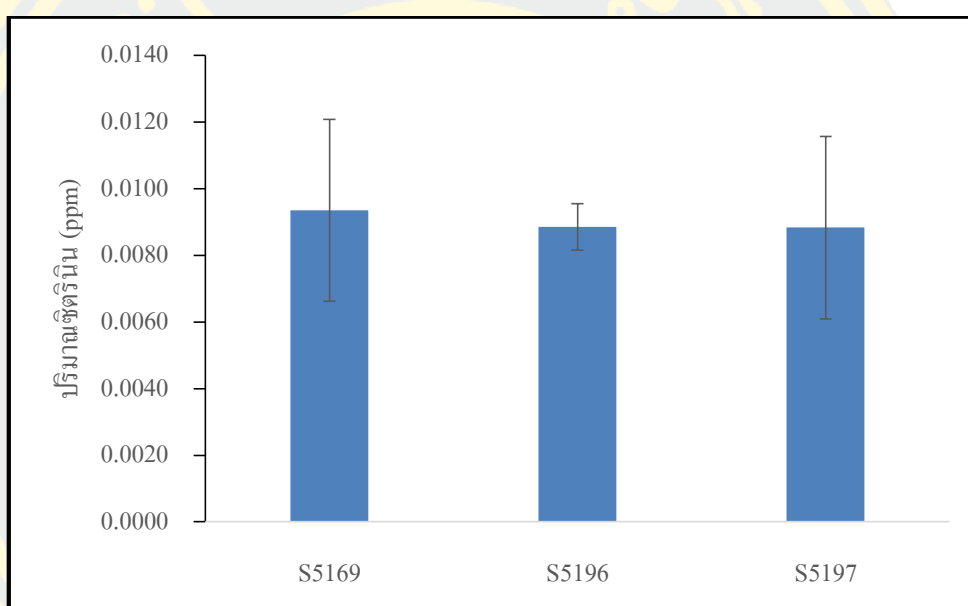
ภาพที่ 4-7 กราฟโครมาโทแกรมของโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงของสารมาตรฐานโมนาโคลิน เค ความเข้มข้น 2 หนึ่งในล้านส่วน



ภาพที่ 4-8 กราฟโครมาโทแกรมของโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงของไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5197 (S5197)

9. ปริมาณซีทรินิน

ตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดง S5169 มีปริมาณสารซีทรินินสูงที่สุด (0.0094 หนึ่งในล้านส่วน) รองลงมา ได้แก่ S5196 (0.0089 หนึ่งในล้านส่วน) และ S5197 (0.0088 หนึ่งในล้านส่วน) ตามลำดับ (ภาพที่ 4-9) ซึ่งแต่ละตัวอย่างมีปริมาณซีทรินินแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ทั้งนี้ทุกตัวอย่างมีปริมาณสารซีทรินินต่ำมาก และไม่เกินมาตรฐานตามข้อกำหนดของ องค์การสหภาพยุโรป (European Union; EU) ซึ่งกำหนดให้ผลิตภัณฑ์อาหารที่เติมข้าวแดงต้องมี ปริมาณซีทรินินไม่เกิน 2 หนึ่งในล้านส่วน (European, 2014)



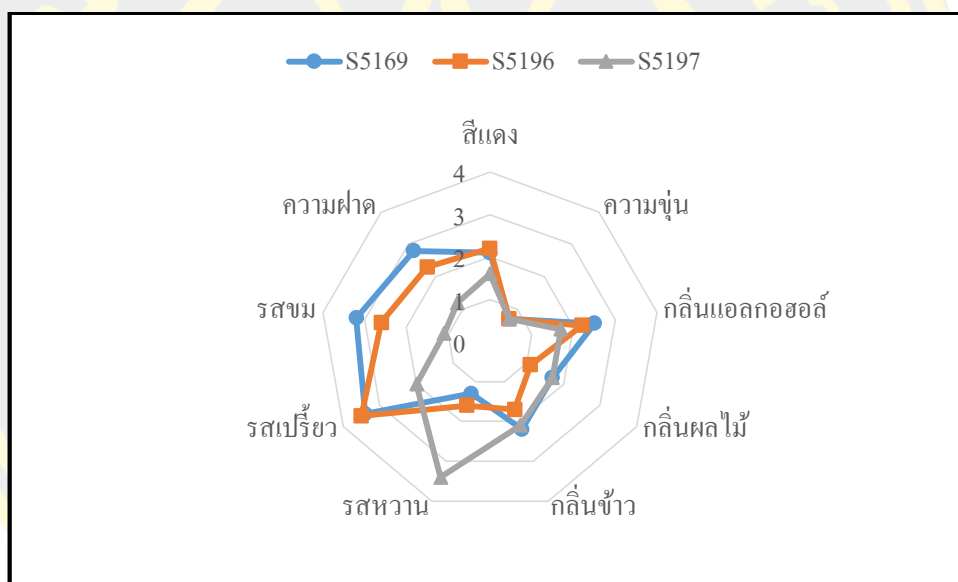
ภาพที่ 4-9 ปริมาณซีทรินินของไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5169 (S5169), TISTR 5196 (S5196) และ TISTR 5197 (S5197)

10. คุณภาพทางด้านประสาทสัมผัส

ภาพที่ 4-10 แสดงคุณลักษณะทางด้านประสาทสัมผัสของตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วยยีสต์สายพันธุ์ต่าง ๆ ด้วยวิธี Scoring test ผลการทดลองพบว่า ไวน์โคจิข้าวแดง S5169 มีความเข้มข้นทางด้านกลิ่นแอลกอฮอล์ รสขม และความฝาดสูงที่สุด รองลงมาคือตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดง S5196 และ S5197 ตามลำดับ ขณะที่ตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดง S5197 มีความเข้มข้นรสหวานสูงที่สุด รองลงมาคือตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดง S5196 และ S5169 ตามลำดับ ตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดง S5169 และ S5196 มีความเข้มข้นที่คล้ายคลึงกันในด้านสีแดง และรสเปรี้ยว ส่วนตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดง S5169 และ S5197 มีความเข้มข้นทางด้านกลิ่นข้าว และกลิ่นผลไม้คล้ายคลึงกัน และทุกตัวอย่างมีความเข้มข้นด้านความขุ่นคล้ายคลึงกัน จากผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสเมื่อพิจารณา

ทางด้านกลิ่น และรสชาติ พบว่า ตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดง S5169 มีคุณลักษณะทางด้านกลิ่น และรสชาติที่กลมกล่อมมากกว่าตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดง S5196 และ S5197 ขณะที่ตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดง S5196 แสดงคุณลักษณะเด่นด้านรสเปรี้ยว และตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดง S5197 แสดงคุณลักษณะเด่นด้านรสหวาน

จากการประเมินคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดง พบว่า ไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วยยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* TISTR 5169 มีคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสที่ดีที่สุด เนื่องจากให้คุณลักษณะทางด้านกลิ่น และรสชาติที่กลมกล่อม ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้เลือกไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วยยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* TISTR 5169 ไปใช้สำหรับการหมักน้ำส้มสายชูในการทดลองต่อไป



ภาพที่ 4-10 คุณภาพทางประสาทสัมผัสของไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5169 (S5169), TISTR 5196 (S5196) และ TISTR 5197 (S5197)

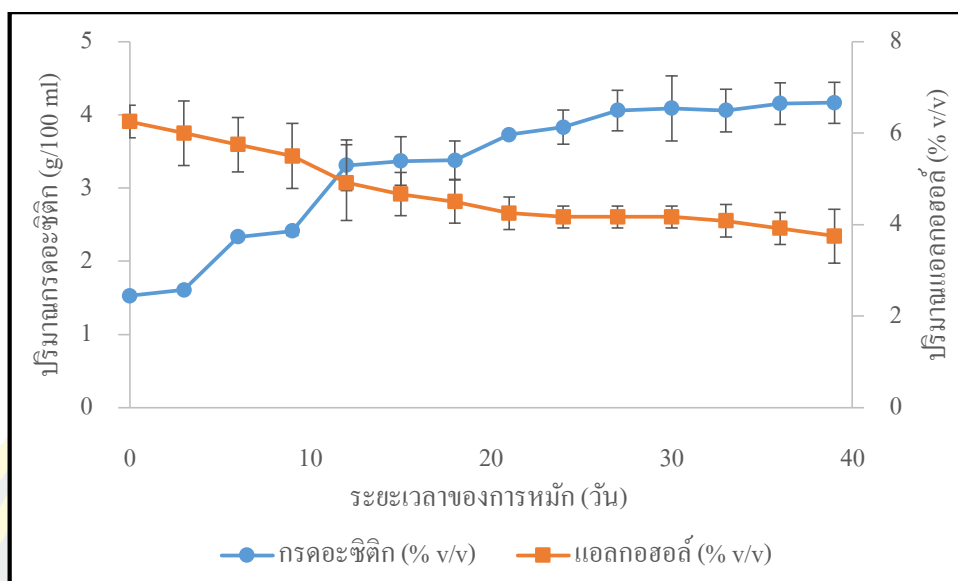
ศึกษาคุณภาพของน้ำส้มสายชูโคจิข้าวแดงที่ผลิตจากผลพลอยได้พาสตาข้าวเจ้า

1. ปริมาณกรดอะซิติก และปริมาณแอลกอฮอล์

ภาพที่ 4-11 แสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดอะซิติก และแอลกอฮอล์ของน้ำส้มสายชูโคจิข้าวแดงในระหว่างการหมักด้วย *A. pasteurianus* TISTR 102 ผลการทดลอง พบว่า ปริมาณแอลกอฮอล์ของน้ำส้มสายชูโคจิข้าวแดงลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ตลอดระยะเวลาจากหมัก โดยตัวอย่างปริมาณแอลกอฮอล์เริ่มต้นเท่ากับร้อยละ 6.25% (โดยปริมาตร) และมีปริมาณแอลกอฮอล์เท่ากับร้อยละ 3.75 (โดยปริมาตร) เมื่อทำการหมักเป็นระยะเวลา 39 วัน ขณะที่ตัวอย่าง

มีปริมาณกรดอะซิติกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ตลอดระยะเวลาการหมัก โดยมีปริมาณกรดอะซิติกเริ่มต้น (0 วัน) เท่ากับ 1.53 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร และวันสุดท้ายของการหมัก (39 วัน) มีปริมาณกรดอะซิติกเท่ากับ 4.16 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ผลการทดลองอธิบายได้ว่าแบคทีเรียกรดอะซิติก (*A. pasteurianus*) ออกซิไดซ์แอลกอฮอล์เป็นกรดอะซิติกในระหว่างการหมัก โดยแอลกอฮอล์จะถูกออกซิไดซ์เป็นอะซิไทลดีไฮด์ด้วยเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส จากนั้นน้ำจะรวมตัวกับอะซิไทลดีไฮด์ได้เป็นไฮดรอะซิไทลดีไฮด์ และถูกออกซิไดซ์ไปเป็นกรดอะซิติกด้วยเอนไซม์แอลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (Novelina, Nazir, Fiana, & Putra, 2019)

ผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Wang et al. (2015) ผู้ซึ่งทำการหมักน้ำส้มสายชูจากข้าว พบว่า ในระหว่างการหมักนั้นน้ำส้มสายชูข้าวมีปริมาณกรดอะซิติกเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการหมัก และมีปริมาณแอลกอฮอล์ลดลงระหว่าง 0-40 ชั่วโมง จากนั้นมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในระหว่าง 50-80 ชั่วโมง แล้วลดลงจนถึงสิ้นสุดการหมัก โดยเมื่อสิ้นสุดการหมักตัวอย่างมีปริมาณแอลกอฮอล์ประมาณร้อยละ 2 (โดยปริมาตร) และกรดอะซิติกประมาณร้อยละ 9.5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ทั้งนี้ปัจจัยหลายปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการหมักกรดอะซิติก เช่น วัตถุประสงค์ อุณหภูมิ ค่า pH ปริมาณออกซิเจน และสายพันธุ์จุลินทรีย์ เป็นต้น วัตถุประสงค์เป็นปัจจัยที่สำคัญเนื่องจากจุลินทรีย์ต้องการสารอาหารมาใช้สำหรับการเจริญ และผลิตผลิตภัณฑ์ในระหว่างการหมัก นอกจากนี้ ปริมาณออกซิเจนก็มีความสำคัญในการหมักน้ำส้มสายชูเช่นเดียวกัน โดยแบคทีเรียกรดอะซิติกต้องการออกซิเจนที่เพียงพอเพื่อที่จะออกซิไดซ์แอลกอฮอล์เป็นกรดอะซิติก หากในระบบมีออกซิเจนน้อยจะทำให้แบคทีเรียกรดอะซิติกสามารถออกซิไดซ์แอลกอฮอล์เป็นกรดอะซิติกได้เพียงเล็กน้อยทำให้ต้องใช้ระยะเวลาในการหมักนาน อีกทั้งยีสต์อาจเจริญเติบโตในระบบได้ทำให้เกิดการหมักแอลกอฮอล์ซึ่งส่งผลกระทบต่อคุณภาพของน้ำส้มสายชู (Novelina et al., 2019)



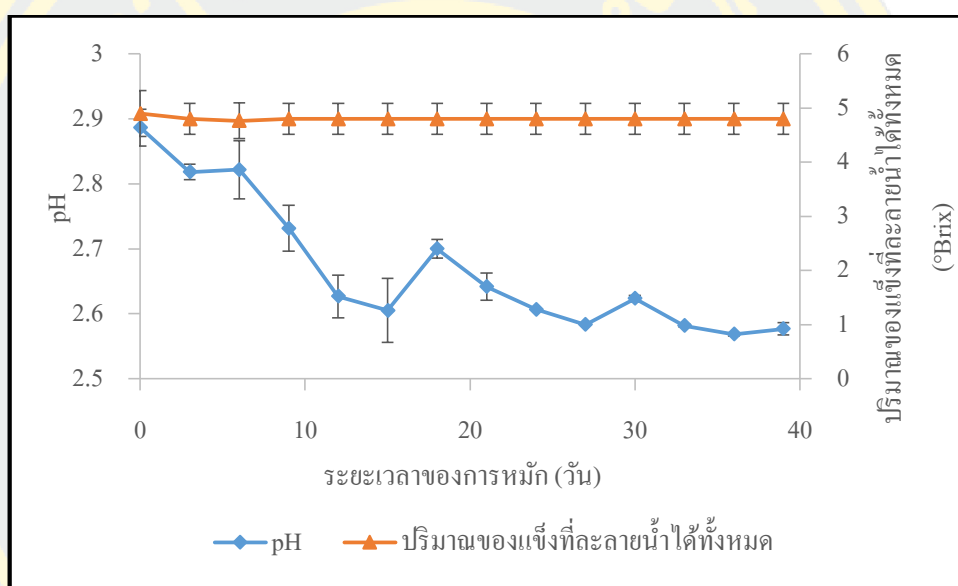
ภาพที่ 4-11 ปริมาณกรดอะซิติก และปริมาณแอลกอฮอล์ของน้ำส้มสายชูโคจิข้าวแดงในระหว่างการหมักด้วย *Acetobacter pasteurianus* TISTR 102

2. ค่า pH และปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด

ภาพที่ 4-12 แสดงการเปลี่ยนแปลงค่า pH และปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดในระหว่างการหมักน้ำส้มสายชูโคจิข้าวแดงด้วย *A. pasteurianus* TISTR 102 ผลการทดลอง พบว่าน้ำส้มสายชูโคจิข้าวแดงมีค่า pH ลดลงเล็กน้อย ตลอดระยะเวลาการหมัก โดยค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 2.89 และเมื่อสิ้นสุดการหมักตัวอย่างมีค่า pH เท่ากับ 2.58 ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของกรดอะซิติกในระบบ โดยแบคทีเรียกรดอะซิติกได้ผลิตกรดอินทรีย์ เช่น กรดอะซิติก กรดซิตริก กรดซัคซินิก และกรดทาร์ทาริก เป็นต้น จึงทำให้น้ำส้มสายชูมีค่า pH ลดลงในระหว่างการหมัก (Hsieh et al., 2013) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Phuapaiboon (2017) ผู้ซึ่งทำการหมักน้ำส้มสายชูจากข้าวงอก โดยใช้วัตถุดิบในการหมักได้แก่ ข้าวไรซ์เบอร์รี่ ข้าวไรซ์เบอร์รี่งอก ข้าวหอมนิลงอก และข้าวหอมแดงงอก ผลการทดลองพบว่า น้ำส้มสายชูแต่ละตัวอย่างมีค่า pH ลดลงเพียงเล็กน้อยตลอดระยะเวลาการหมัก โดยค่า pH เริ่มต้นเฉลี่ยแต่ละตัวอย่างเท่ากับ 3.85 และมีค่าลดลงเท่ากับ 3.43 เมื่อสิ้นสุดการหมักนาน 13 วัน

นอกจากนี้ผลการทดลองพบว่า ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดค่อนข้างคงที่ตลอดระยะเวลาของการหมัก ($p > 0.05$) โดยน้ำส้มสายชูโคจิข้าวแดงมีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดแปรผันอยู่ระหว่าง 4.9-4.8 องศาบริกซ์ ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบกับ การลดลงของแอลกอฮอล์ พบว่าแอลกอฮอล์ลดลงมากกว่าปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดในระหว่างการหมัก แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียกรดอะซิติกใช้แอลกอฮอล์เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรด

ซิติคมากกว่าน้ำตาล โดยธรรมชาติแบคทีเรียกรดอะซิติกจะสามารถออกซิไดซ์แอลกอฮอล์เป็นกรดอะซิติก แล้วอาจใช้กรดอะซิติก และกรดแลกติกเป็นแหล่งคาร์บอน และปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำเป็นผลิตภัณฑ์ (Hsieh et al., 2013) จากงานวิจัยของ (Li et al., 2014) ได้ทำการหมักน้ำส้มสายชูจากเห็ด *Hericium erinaceus* พบว่า ในระหว่างการหมักน้ำส้มสายชูนั้นปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดปริมาณลดลงเล็กน้อยตลอดระยะเวลาของการหมัก ซึ่งน้ำส้มสายชูเห็ดมีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดเริ่มต้นประมาณ 5.45 องศาบริกซ์ และเมื่อสิ้นสุดการหมักมีปริมาณของแข็งที่สามารถละลายน้ำได้ทั้งหมดประมาณ 5 องศาบริกซ์



ภาพที่ 4-12 ค่า pH และปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดของน้ำส้มสายชูโคจิข้าวแดงในระหว่างการหมักด้วย *Acetobacter pasteurianus* TISTR 102

3. จำนวนยีสต์ และรา และแบคทีเรียกรดอะซิติก

จากการวิเคราะห์คุณภาพด้านจุลินทรีย์ในระหว่างการหมักน้ำส้มสายชูโคจิข้าวแดง พบว่า ไม่พบยีสต์ในระหว่างการหมักกรดอะซิติก แต่พบรา *M. purpureus* เนื่องจากมีเพียงโคโลนีสีแดงของ *M. purpureus* เจริญเมื่อทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จากตารางที่ 4-4 พบว่า รา *M. purpureus* มีจำนวนค่อนข้างคงที่ในระหว่างการหมัก โดยมีจำนวนราแปรผันอยู่ระหว่าง 3.24-3.96 log CFU/ml ทั้งนี้ราสามารถรอดชีวิตได้ในระหว่างการหมักกรดน้ำส้มสายชู ซึ่งเป็นสภาวะที่มีความเข้มข้นกรดสูง เนื่องจากรามีโครงสร้างผนังเซลล์เป็นเปลือกแข็งห่อหุ้ม ซึ่งประกอบด้วยสารหลายชนิดที่สำคัญ ได้แก่ ไคติน กลูแคน เซลลูโลส เป็นต้น และรา *Monascus* sp. มีเส้นใยแบบมีผนังกั้น (septate hyphae) ซึ่งมีช่องเปิดเพียงช่องเดียวและมี woronin bodies ทำหน้าที่อุดช่องได้เมื่อ

เกิดอันตรายต่อเซลล์ อีกทั้งในระบบมือออกซิเจน ซึ่งจำเป็นต่อการดำรงชีวิตของรา (กึ่งจันทน์ มะลิ ซ้อน, 2557)

จำนวนแบคทีเรียกรดอะซิติกเริ่มต้นในน้ำส้มสายชูโคจิข้าวแดงเท่ากับ 6.05 log CFU/ml และแบคทีเรียกรดอะซิติกเจริญเติบโตระหว่างการหมัก โดยมีจำนวนเพิ่มขึ้นจากวันที่ 0 ถึงวันที่ 12 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ซึ่งตัวอย่างมีจำนวนแบคทีเรียกรดอะซิติกเท่ากับ 7.26 log CFU/ml เมื่อหมักนาน 12 วัน จากนั้นจำนวนแบคทีเรียกรดอะซิติกมีแนวโน้มลดลงเพียงเล็กน้อย และค่อนข้างคงที่จากวันที่ 15 ถึง 39 วันของการหมัก โดยวันสุดท้ายของการหมัก (39 วัน) น้ำส้มสายชูโคจิข้าวแดงมีจำนวนแบคทีเรียกรดอะซิติกเท่ากับ 6.02 log CFU/ml ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า *A. pasteurianus* เป็นแบคทีเรียทนกรด ซึ่งสามารถรอดชีวิตได้เป็นอย่างดีในสภาวะที่เป็นกรดสูง ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Li et al. (2014) ผู้ซึ่งรายงานว่าจำนวนแบคทีเรียกรดอะซิติกในน้ำส้มสายชูเห็ด *H. erinaceus* มีจำนวนเพิ่มขึ้นจากวันที่ 0 ถึงวันที่ 3 แล้ว จากนั้นจำนวนแบคทีเรียกรดอะซิติกมีจำนวนแนวโน้มลดลงตลอดระยะเวลาการหมักนาน 9 วัน

ตารางที่ 4-4 จำนวนรา และแบคทีเรียกรดอะซิติกในระหว่างการหมักน้ำส้มสายชูโคจิข้าวแดงด้วย *Acetobacter pasteurianus* TISTR 102

ระยะเวลาของการหมัก (วัน)	จำนวนรา (log CFU/ml)	จำนวนแบคทีเรียกรดอะซิติก (log CFU/ml)
0	3.79±0.12 ^{abc}	6.05±0.09 ^c
3	3.90±0.35 ^{ab}	6.39±0.14 ^c
6	3.85±0.11 ^{abc}	6.50±0.12 ^{bc}
9	3.88±0.10 ^{ab}	7.11±0.02 ^{ab}
12	3.96±0.05 ^a	7.26±0.25 ^a
15	3.83±0.25 ^{abc}	6.37±0.04 ^c
18	3.47±0.10 ^{abcd}	6.12±0.00 ^c
21	3.65±0.36 ^{abcd}	6.03±0.07 ^c
24	3.55±0.21 ^{abcd}	6.18±0.09 ^c
27	3.50±0.14 ^{abcd}	6.28±0.07 ^c
30	3.24±0.34 ^d	6.02±0.25 ^c
33	3.24±0.34 ^{cd}	5.97±0.15 ^c
36	3.39±0.09 ^{bcd}	6.15±0.37 ^c
39	3.43±0.05 ^{abcd}	6.45±0.11 ^c

a, b, c, d คือ ค่าเฉลี่ยในแถวแนวตั้งที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

4. ฟีนอลิกทั้งหมด ความเข้มข้นรงควัตถุฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH โมนาโคลิน เล ซิตรีนิน และฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส

ตารางที่ 4-5 แสดงคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของน้ำส้มสายชูโคจิข้าวแดงภายหลังการหมักนาน 39 วัน ด้วย *A. pasteurianus* TISTR 102 ผลการทดลองพบว่า น้ำส้มสายชูโคจิข้าวแดง มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 71.70 $\mu\text{g GAE/ml}$ และมีปริมาณรงควัตถุสีเหลือง สีส้ม และสีแดงเท่ากับ 0.17, 0.08 และ 0.06 OD units/g ตามลำดับ ทั้งนี้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของน้ำส้มสายชูโคจิข้าวแดงมีปริมาณมากกว่าในไวน์โคจิข้าวแดง (40.79 $\mu\text{g GAE/ml}$) ประมาณ 1.8 เท่า แต่น้ำส้มสายชูโคจิข้าวแดงมีปริมาณรงควัตถุสีเหลือง สีส้ม และสีแดงน้อยกว่าไวน์โคจิข้าวแดงประมาณ 2.2, 2.0 และ 2.8 เท่า ตามลำดับ ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Hsieh et al. (2013) ซึ่งรายงานว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในน้ำส้มสายชูโคจิข้าว

แดงจะเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการหมักกรดอะซิติก และน้ำส้มสายชูโคจิข้าวแดงยังมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (87 μg GAE/ml) มากกว่าไวน์โคจิข้าวแดง (56 μg GAE/ml) เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Li et al. (2014) รายงานว่าน้ำส้มสายชูเห็ด *H. erinaceus* มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (7.75 mg GAE/ml) มากกว่าไวน์เห็ด *H. erinaceus* (2.68 mg GAE/ml) ซึ่งปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในน้ำส้มสายชูสูงกว่าในไวน์ อาจเป็นผลมาจากสาร Folin-Ciocalteu ทำปฏิกิริยากับสารประกอบอื่น ๆ ในน้ำส้มสายชู เช่น thiols ไอออนอนินทรีย์ อนุพันธ์ของวิตามิน และกรดอะมิโน เป็นต้น (Li et al., 2014) ทั้งนี้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของน้ำส้มสายชูโคจิข้าวแดงจากงานวิจัยนี้มีน้อยกว่าเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Hsieh et al. (2013)

นอกจากนี้ น้ำส้มสายชูโคจิข้าวแดงยังแสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูง โดยตัวอย่างมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับร้อยละ 58.75 ซึ่งมากกว่าไวน์โคจิข้าวแดง (ร้อยละ 15.36) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า น้ำส้มสายชูโคจิข้าวแดงประกอบด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น กรดอะซิติก เมลานอยดิน (Hsieh et al., 2013) สารประกอบโพลีฟีนอล เช่น กรดไดไฮโดรเพอรูริก และกรดไดไฮโดรซิแนพพิค เป็นต้น (Chen et al., 2016) และรังกวิตูจากรา *Monascus* (Jirasatid et al., 2013) เป็นต้น และงานวิจัยของ Hsieh et al. (2013) รายงานว่า กรดอะซิติกความเข้มข้นร้อยละ 4.5 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับร้อยละ 32.1 ทั้งนี้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของน้ำส้มสายชูโคจิข้าวแดงจากงานวิจัยนี้มีสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Hsieh et al. (2013)

โมนาโคลิน เค เป็นสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิของรา *M. purpureus* มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMG-CoA reductase) ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญที่ควบคุมการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลในตับ (Hsieh et al., 2013) จากการทดลอง พบว่า น้ำส้มสายชูโคจิข้าวแดงมีปริมาณ โมนาโคลิน เค เท่ากับ 14.11 ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม ซึ่งมากกว่าไวน์โคจิข้าวแดง (ปราศจากโมนาโคลิน เค) ผลการทดลองสามารถอธิบายได้ว่ารา *M. purpureus* สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในระหว่างการหมักน้ำส้มสายชูโคจิข้าวแดง (จากข้อมูลข้างต้น) ดังนั้นรา *M. purpureus* จึงมีกิจกรรมของเซลล์ เช่นการผลิตสารเมแทบอลิต์ต่าง ๆ เช่น โมนาโคลิน เค เป็นต้น อย่างไรก็ตามไม่พบซิตรีนิน ซึ่งเป็นสารพิษที่สังเคราะห์จากรา *M. purpureus* ในน้ำส้มสายชูโคจิข้าวแดง ซึ่งอาจเป็นผลมาจากซิตรีนินไม่มีความคงตัว หรือเสื่อมสลายในระหว่างการหมักกรดอะซิติกซึ่งเป็นสภาวะที่มีความเป็นกรดสูง (Hsieh et al., 2013) ทั้งนี้ปริมาณซิตรีนินในน้ำส้มสายชูโคจิข้าวแดงเป็นไปตามข้อกำหนดขององค์การสหภาพยุโรป (European Union; EU) ซึ่งกำหนดให้ผลิตภัณฑ์อาหารที่เติมข้าวแดงต้องมียปริมาณซิตรีนินไม่เกิน 2 หนึ่งในส่วน (European Union12, 2014)

เอนไซม์แซนทีนออกซิเดส เป็นเอนไซม์ที่เร่งการเปลี่ยนไฮโปแซนทีนเป็นแซนทีนแล้วจะออกซิไดซ์แซนทีนให้อยู่ในรูปของกรดยูริก ซึ่งโดยปกติกรดยูริกจะถูกกำจัดออกทางปัสสาวะ แต่เมื่อมีกรดยูริกในกระแสโลหิตสูงจะทำให้เกิดการสะสมเกลือยูเรตในเนื้อเยื่อ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในบริเวณข้อต่อทำให้เกิดโรคข้อต่ออักเสบแบบเฉียบพลัน หรือ โรคเกาต์ (Hsieh et al., 2013) ผลการทดลอง พบว่า น้ำส้มสายชูโคจิข้าวแดงมีฤทธิ์ยับยั้งแซนทีนออกซิเดส เท่ากับร้อยละ 71.70 แนะนำได้ว่าฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส อาจเป็นมาจากกรดอะซิติก และสาร 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF) และ 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxylic acid (MTCA) ซึ่งเป็นสารยับยั้งแซนทีนออกซิเดส ที่พบในน้ำส้มสายชูโคจิข้าวแดง (Lin et al., 2012) ทั้งนี้ น้ำส้มสายชูโคจิข้าวแดงที่หมักด้วยผลพลอยได้พาสตาข้าวเจ้า จากงานวิจัยนี้มีฤทธิ์ยับยั้งแซนทีนออกซิเดสน้อยกว่าสารอัลโลพูรินอล (ยาที่ใช้ในการรักษาโรคเกาต์) ที่ความเข้มข้น 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพียงเล็กน้อย ซึ่งสารอัลโลพูรินอล มีฤทธิ์การยับยั้งแซนทีนออกซิเดส เท่ากับร้อยละ 84.07 นอกจากนี้ตัวอย่างยังมีฤทธิ์ยับยั้งแซนทีนออกซิเดส สูงกว่างานวิจัยของ Hsieh et al. (2013) ซึ่งรายงานว่า น้ำส้มสายชูโคจิข้าวแดง (ประกอบด้วยกรดอะซิติกร้อยละ 4.26) และสารละลายกรดอะซิติกความเข้มข้นร้อยละ 4.5 มีฤทธิ์ยับยั้งแซนทีนออกซิเดส เท่ากับร้อยละ 55.9 และ 37 ตามลำดับ

ตารางที่ 4-5 คุณสมบัติเชิงหน้าที่ในตัวอย่างน้ำส้มสายชูโคจิข้าวแดงที่หมักด้วย *Acetobacter pasteurianus* TISTR 102

ส่วนประกอบ	ปริมาณ
ฟีนอลิกทั้งหมด ($\mu\text{g GAE/ml}$)	71.70 \pm 13.3
รงควัตถุสีเหลือง (OD unit/g)	0.17 \pm 0.07
รงควัตถุสีส้ม (OD unit/g)	0.08 \pm 0.01
รงควัตถุสีแดง (OD unit/g)	0.06 \pm 0.00
โมนาโคลิน เค (ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม)	14.11 \pm 2.30
ซิทรีนิน (ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม)	ND
ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (ร้อยละ)	58.75 \pm 2.48
ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์ xanthine oxidase (ร้อยละ)	71.70 \pm 13.34

ND ไม่สามารถตรวจพบได้

งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จในการใช้ประโยชน์จากผลพลอยได้พาสตาข้าวเจ้าเป็น
ชั้นสเตรตสำหรับการผลิตน้ำส้มสายชูโคจิข้าวแดง โดยผลิตภัณฑ์มีคุณสมบัติเชิงหน้าที่ เนื่องจาก
ประกอบด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด เช่น ฟีนอลิก รงควัตถุ โมโนโคลิน เค และ
ปราศจากสารพิษซิทรีนิน อีกทั้งแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และฤทธิ์ยับยั้งแซนทีนออกซิ
เดสในปริมาณสูง



บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จในการใช้ประโยชน์จากผลพลอยได้พาสตาข้าวเจ้า เพื่อผลิตน้ำส้มสายชูที่มีคุณภาพ โดยจากการศึกษาสายพันธุ์ยีสต์ต่อคุณภาพของไวน์โคจิข้าวแดงที่ผลิตจากผลพลอยได้พาสตาข้าวเจ้า พบว่า สายพันธุ์ยีสต์มีผลต่อคุณภาพของไวน์โคจิข้าวแดง ยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5169, TISTR 5196 และ TISTR 5197 เจริญเติบโต และรอดชีวิตในระหว่างการหมักแอลกอฮอล์ อีกทั้งรา *M. purpureus* จากโคจิข้าวแดงสามารถรอดชีวิตในระหว่างการหมักเช่นเดียวกัน โดยยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* TISTR 5169 สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้สูง ในระยะเวลาสั้นกว่ายีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* TISTR 5196 และ TISTR 5197 นอกจากนี้จากการทดสอบทางประสาทสัมผัสไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วยยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* TISTR 5169 พบว่า ตัวอย่างมีคุณภาพทางด้านประสาทสัมผัสที่ดีกว่าไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วยยีสต์สายพันธุ์อื่น อย่างไรก็ตาม ไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วยสายพันธุ์ต่าง ๆ มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณรงควัตถุสีเหลือง สีส้ม และสีแดง ปริมาณสารชิตริ닌 และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ และทุกตัวอย่างตรวจไม่พบสาร โมนาโคลินเค ผลการทดลองนี้สรุปได้ว่า ไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วยยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* TISTR 5169 เหมาะสำหรับนำไปใช้ในการหมักน้ำส้มสายชูต่อไป

จากการศึกษาคุณภาพของน้ำส้มสายชูโคจิข้าวแดงที่ผลิตจากผลพลอยได้พาสตาข้าวเจ้า สามารถสรุปได้ว่า แบคทีเรียกรดอะซิติก (*A. pasteurianus* TISTR 102) เจริญเติบโต และรอดชีวิต อีกทั้งผลิตกรดอะซิติกในระหว่างการหมักกรดอะซิติก โดยน้ำส้มสายชูโคจิข้าวแดงมีปริมาณกรดอะซิติกไม่น้อยกว่าร้อยละ 4 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เมื่อทำการหมักเป็นระยะเวลา 27 วัน นอกจากนี้ น้ำส้มสายชูโคจิข้าวแดงยังมีสมบัติเชิงหน้าที่ โดยมีปริมาณรงควัตถุสีเหลือง สีส้ม และสีแดง เท่ากับ 0.17, 0.08 และ 0.06 OD unit/g substrate ตามลำดับ และมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณสาร โมนาโคลิน เค ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส เท่ากับ 71.70 μg GAE/ml 14.11 ไมโครกรัมต่อ 100 กรัม ร้อยละ 58.75 และร้อยละ 71.70 ตามลำดับ และไม่พบสารพิษชิตริ닌ในน้ำส้มสายชูโคจิข้าวแดง

ข้อเสนอแนะ

1. ควรทำการศึกษาปริมาณ โคจิข้าวแดงที่เหมาะสมสำหรับการหมักไวน์โคจิข้าวแดง เพื่อให้มีโมนาโคลิน เคนสูง และซิทรีนินไม่เกินที่มาตรฐานกำหนด
2. อาจนำผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมอื่นมาศึกษาเพิ่มเติม เช่น ผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมการผลิตแป้ง เป็นต้น



บรรณานุกรม

- เกศรินทร์ ไกลถิ่น. (2557). การใช้ข้าวตอกเกรดสำหรับการผลิตน้ำส้มสายชูข้าว. (วิทยาศาสตร์
มหบัณฑิต), มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี, กรุงเทพมหานคร.
- กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์ และสมจิตต์ ปาสะภาส. (2551). การพัฒนาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการ
ผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากข้าวกล้องไทย (*Oryza sativa L.*) ในระดับห้องปฏิบัติการ. ชลบุรี:
มหาวิทยาลัยบูรพา.
- กิ่งจันทร์ มะลิซ้อน. (2557). คู่มือปฏิบัติการราวิทยา. สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี: อุดรธานี.
- คุณธิ ชนะบริพัฒน์. (2555). จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. กรุงเทพฯ: หจก. วิ.เจ.พรินต์ติ้ง.
ประวีณา ลาภา. (2554). การพัฒนาผลิตภัณฑ์น้ำส้มสายชูหมักจากข้าวเหนียวดำกล้อง. (วิทยาศาสตร์
มหบัณฑิต), มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิชยา รัตนาปนนท์. (ม.ป.ป.). โครงสร้างของเม็ดแป้ง. Retrieved from
[http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/0567/starch-granule-
%E0%B9%80%E0%B8%A1%E0%B9%87%E0%B8%94%E0%B8%AA%E0%B8%95%
E0%B8%B2%E0%B8%A3%E0%B9%8C%E0%B8%8A](http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/0567/starch-granule-%E0%B9%80%E0%B8%A1%E0%B9%87%E0%B8%94%E0%B8%AA%E0%B8%95%E0%B8%B2%E0%B8%A3%E0%B9%8C%E0%B8%8A)
- พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิชยา รัตนาปนนท์. (ม.ป.ป.). โครงสร้างของอะไมโลเพคติน. Retrieved
from [http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/0566/amylopectin-
%E0%B8%AD%E0%B8%B0%E0%B9%84%E0%B8%A1%E0%B9%82%E0%B8%A5%
E0%B9%80%E0%B8%9E%E0%B8%81%E0%B8%97%E0%B8%B4%E0%B8%99](http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/0566/amylopectin-%E0%B8%AD%E0%B8%B0%E0%B9%84%E0%B8%A1%E0%B9%82%E0%B8%A5%E0%B9%80%E0%B8%9E%E0%B8%81%E0%B8%97%E0%B8%B4%E0%B8%99)
- พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิชยา รัตนาปนนท์. (ม.ป.ป.). โครงสร้างของอะไมโลส. Retrieved from
[http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/0184/amylose-
%E0%B8%AD%E0%B8%B0%E0%B9%84%E0%B8%A1%E0%B9%82%E0%B8%A5%
E0%B8%AA](http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/0184/amylose-%E0%B8%AD%E0%B8%B0%E0%B9%84%E0%B8%A1%E0%B9%82%E0%B8%A5%E0%B8%AA)
- มะลิวัลย์ ชั่วสุวรรณ. (2556). การแยกและการคัดกรองจุลินทรีย์เพื่อการผลิตน้ำส้มสายชูจากน้ำผึ้ง.
(วิทยาศาสตร์มหบัณฑิต), มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.
- รติดา โอสถานนท์. (2558). เทคโนโลยีของัญชาติ. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง.
- รุ่งลักษณ์ ประทุมชัย. (2559). การผลิตข้าวแดงจากปลายข้าวโดยเชื้อรา *Monascus sp* และการ

- ประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกอีสาน. (วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต), มหาวิทยาลัยมหาสารคาม, สำนักวิทยบริการ.
- สมบัติ กำมอญ. (2552). เงื่อนไขที่เหมาะสมสำหรับการอบแห้งข้าวหอมมะลิด้วยเทคนิคฟลูอิดไอเซชัน. (วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต), มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี, กรุงเทพมหานคร.
- สาวิตรี ลิ้มทอง. (2549). ยีสส์ : ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุชาติ ไม้สนธิ์ และสิริธร ชีระเวทย์. (2559). การพัฒนากระบวนการผลิตข้าวแดง (อังกฤษ) จากปลายข้าวและการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร. มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร. สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ, กรุงเทพฯ.
- อรอนงค์ นัยวิกุล. (2547). ข้าว : วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- AOAC. (2007). Vinegars. Retrieved from <http://www.eoma.aoac.org/methods/info.asp?ID=12184>
- AOAC. (2016). *Official methods of analysis of AOAC International*. United States: Rockville, MD.
- Cai, H., Zhang, T., Zhang, Q., Luo, J., Cai, C., & Mao, J. (2018). Microbial diversity and chemical analysis of the starters used in traditional Chinese sweet rice wine. *Food Microbiology*, 73, 319-326.
- Chay, C., Dizon, E. I., Hurtada, W. A., Elegado, F. B., Norng, C., & Raymundo, L. C. (2020). Total phenolic content and antioxidant activity of rice wine from waxy pigmented and non-pigmented rice varieties produced by traditional and multi-parallel fermentation. *Food Research*, 4(1), 199-206.
- Chen, G.-L., Zheng, F.-J., Sun, J., Li, Z.-C., Lin, B., & Li, Y.-R. (2015). Production and characteristics of high quality vinegar from sugarcane juice. *Sugar Tech*, 17(1), 89-93.
- Chen, H., Chen, T., Giudici, P., & Chen, F. (2016). Vinegar functions on health: Constituents, sources, and formation mechanisms. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(6), 1124-1138.
- Daroonpant, R., Tanasupawat, S., & Keeratipibul, S. (2016). Characterization and amylolytic activity of yeast and mold strains from Thai sweet rice. *Malaysian Journal of Microbiology*, 12(2), 121-131.
- Dung, N. T. P., Rombouts, F. M., & Nout, M. J. R. (2005). Development of defined mixed-culture

- fungal fermentation starter granulate for controlled production of rice wine. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 6(4), 429-441.
- Dung, N. T. P., Rombouts, F. M., & Nout, M. J. R. (2006). Functionality of selected strains of moulds and yeasts from Vietnamese rice wine starters. *Food Microbiology*, 23(4), 331-340.
- Elumalai, P., Park, Y. J., Cho, M., Shea, P. J., & Oh, B. T. (2019). Red yeast rice fermentation with *Bacillus subtilis* B2 under blue light-emitting diodes increases antioxidant secondary products (Manuscript ID: BPBSE-18-0387). *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 42(4), 529-539.
- European. (2014, 6 มีนาคม 2014). Commission Regulation (EU) No 212/2014 of 6 March 2014 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of the contaminant citrinin in food supplements based on rice fermented with red yeast *Monascus purpureus* Text with EEA relevance. Retrieved from https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=uriserv:OJ.L_.2014.067.01.0003.01.ENG
- Ho, C. W., Lazim, A. M., Fazry, S., Zaki, U. K. H. H., & Lim, S. J. (2017). Varieties, production, composition and health benefits of vinegars: A review. *Food Chemistry*, 221, 1621-1630.
- Hsieh, C.-W., Lu, Y.-R., Lin, S.-M., Lai, T.-Y., & Chiou, R. Y. Y. (2013). Stability of Monacolin K and Citrinin and Biochemical Characterization of Red-Koji Vinegar during Fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(30), 7276-7283.
- Instruments Direct Services Limited. (n.d.). *Acetobacter aceti*. Retrieved from <https://www.inds.co.uk/product/acetobacter-aceti-manufacture-of-vinegar-smear/>
- Jacki, B., & Alexandra, A. (2012). *Saccharomyces cerevisiae*. Retrieved from https://www.wikidoc.org/index.php/Saccharomyces_cerevisiae
- Jiang, L., Su, W., Mu, Y., & Mu, Y. (2020). Major Metabolites and Microbial Community of Fermented Black Glutinous Rice Wine With Different Starters. *Frontiers in Microbiology*, 11.
- Jirasatid, S., Nopharatana, M., Kitsubun, P., Vichitsoonthonkul, T., & Tongta, A. (2013). Statistical optimization for Monacolin K and yellow pigment production and citrinin reduction by *Monascus purpureus* in solid-state fermentation. *Journal of microbiology and biotechnology*, 23(3), 364-374.
- Johns, M. R., & Stuart, D. M. (1991). Production of pigments by *Monascus purpureus* in solid

- culture. *Journal of Industrial Microbiology*, 8(1), 23-28.
- Kahraman, G., Harsa, S., Lucisano, M., & Cappa, C. (2018). Physicochemical and rheological properties of rice-based gluten-free blends containing differently treated chickpea flours. *LWT*, 98, 276-282.
- Kim, M. O., Kim, I. D., Dhungana, S. K., Lee, J. W., & Shin, D. H. (2015). Influence of blueberry and black rice powders on quality characteristics of the Korean traditional rice wine takju. *Food Science and Biotechnology*, 24(2), 439-444.
- Li, T., Lo, Y. M., & Moon, B. (2014). Feasibility of using *Hericium erinaceus* as the substrate for vinegar fermentation. *LWT - Food Science and Technology*, 55(1), 323-328.
- Lin, S.-M., Wu, J.-Y., Su, C., Ferng, S., Lo, C.-Y., & Chiou, R. Y.-Y. (2012). Identification and Mode of Action of 5-Hydroxymethyl-2-furfural (5-HMF) and 1-Methyl-1, 2, 3, 4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxylic Acid (MTCA) as Potent Xanthine Oxidase Inhibitors in Vinegars.
- Liu, Z., Wang, Z., Sun, J., & Ni, L. (2020). The dynamics of volatile compounds and their correlation with the microbial succession during the traditional solid-state fermentation of Gutian Hong Qu glutinous rice wine. *Food Microbiology*, 86, 103347.
- Montiel-González, A. M., Fernández, F. J., Keer, N., & Tomasini, A. (2009). Increased PCP removal by *Amylomyces rouxii* transformants with heterologous *Phanerochaete chrysosporium* peroxidases supplementing their natural degradative pathway. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(2), 335-340.
- Nigam, P., & Singh, D. (1995). Enzyme and microbial systems involved in starch processing. *Enzyme and Microbial Technology*, 17(9), 770-778.
- Novelina, Nazir, N., Fiana, R. M., & Putra, D. P. (2019). *Characteristics of Black Glutinous Rice Vinegar as Traditionally Fermented Product of Yeast Tapai and Acetobacter aceti*. Paper presented at the 6th International Conference on Sustainable Agriculture, Food and Energy: Inclusive Agri-Food Energy Production for Community Empowerment in a Changing Climate, SAFE 2018.
- Patel, S. (2016). Functional food red yeast rice (RYR) for metabolic syndrome amelioration: a review on pros and cons. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(5).
- Pattanagul, P., Pinthong, R., Phianmongkhon, A., & Leksawasdi, N. (2007). Review of angkak

- production (*Monascus purpureus*). *Chiang Mai J Sci*, 34(3), 319-328.
- Phuapaiboon, P. (2017). Gamma-aminobutyric acid, total anthocyanin content and antioxidant activity of vinegar brewed from germinated pigmented rice. *Pakistan Journal of Nutrition*, 16(3), 109-118.
- Puertas, B., Jimenez-Hierro, M. J., Cantos-Villar, E., Marrufo-Curtido, A., Carbú, M., Cuevas, F. J., Moreno-Rojas, J. M., González-Rodríguez, V. E., Cantoral, J. M., & Ruiz-Moreno, M. J. (2018). The influence of yeast on chemical composition and sensory properties of dry white wines. *Food Chemistry*, 253, 227-235.
- Rahmani, R., Beaufort, S., Villarreal-Soto, S. A., Taillandier, P., Bouajila, J., & Debouba, M. (2019). Kombucha fermentation of African mustard (*Brassica tournefortii*) leaves: Chemical composition and bioactivity. *Food Bioscience*, 30, 100414.
- Satora, P., Semik-Szczurak, D., Tarko, T., & Budrys, A. (2018). Influence of Selected *Saccharomyces* and *Schizosaccharomyces* Strains and Their Mixed Cultures on Chemical Composition of Apple Wines. *Journal of Food Science*, 83(2), 424-431.
- Seo, S.-H., Park, S.-E., Yoo, S.-A., Lee, K. I., Na, C.-S., & Son, H.-S. (2016). Metabolite profiling of Makgeolli for the understanding of yeast fermentation characteristics during fermentation and aging. *Process Biochemistry*, 51(10), 1363-1373.
- Singkong, W. (2015). The Production of Red Wine from Black Jasmine Rice. *Journal of Food Research*, 4(6), 69-81.
- Somsak. (2538). ส่วนประกอบของเมล็ดข้าว. Retrieved from <https://www.doctor.or.th/article/detail/4032>
- Srianta, I., Zubaidah, E., Estiasih, T., Yamada, M., & Harijono. (2016). Comparison of *Monascus purpureus* growth, pigment production and composition on different cereal substrates with solid state fermentation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 7, 181-186.
- Suraiya, S., Kim, J.-H., Tak, J. Y., Siddique, M. P., Young, C. J., Kim, J. K., & Kong, I.-S. (2018). Influences of fermentation parameters on lovastatin production by *Monascus purpureus* using *Saccharina japonica* as solid fermented substrate. *LWT*, 92, 1-9.
- Tian, S., Nakamura, K., & Kayahara, H. (2004). Analysis of phenolic compounds in white rice, brown rice, and germinated brown rice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(15), 4808-4813.

- Unknown. (2012). Pasta Lunga and Pasta Corta. Retrieved from <http://fovefood.blogspot.com/2012/>
- Van der Maarel, M. J. E. C., Van der Veen, B., Uitdehaag, J. C. M., Leemhuis, H., & Dijkhuizen, L. (2002). Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *Journal of Biotechnology*, *94*(2), 137-155.
- Wang, J.-J., Lee, C.-L., & Pan, T.-M. (2004). Modified mutation method for screening low citrinin-producing strains of *Monascus purpureus* on rice culture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(23), 6977-6982.
- Wang, W., Chen, Q., Zhang, X., Zhang, H., Huang, Q., Li, D., & Yao, J. (2014). Comparison of extraction methods for analysis of citrinin in red fermented rice. *Food Chemistry*, *157*, 408-412.
- Wang, Z., Zang, N., Shi, J., Feng, W., Liu, Y., & Liang, X. (2015). Comparative Proteome of *Acetobacter pasteurianus* Ab3 During the High Acidity Rice Vinegar Fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *177*(8), 1573-1588.
- Wendt, T. (2012). Analysing wine at school.
- Wongpiyachon, S., Youngsuk, L., & Sawangchit, P. (2008). Production of rice wine from pure culture of *Aspergillus oryzae* and *Saccharomyces cerevisiae*.
- Wu, X., Yao, H., Liu, Q., Zheng, Z., Cao, L., Mu, D., Wang, H., Jiang, S., & Li, X. (2018). Producing Acetic Acid of *Acetobacter pasteurianus* by Fermentation Characteristics and Metabolic Flux Analysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1-16.
- Xia, X., Zhu, X., Yang, H., Xin, Y., & Wang, W. (2015). Enhancement of rice vinegar production by modified semi-continuous culture based on analysis of enzymatic kinetic. *European Food Research and Technology*, *241*(4), 479-485.
- Yang, K. R., Yu, H. C., Huang, C. Y., Kuo, J. M., Chang, C., Shieh, C. J., & Kuo, C. H. (2019). Bioprocessed production of resveratrol-enriched rice wine: Simultaneous rice wine fermentation, extraction, and transformation of piceid to resveratrol from *Polygonum cuspidatum* roots. *Foods*, *8*(7).
- Yang, R., Gu, D., & Gu, Z. (2016). Cordyceps Rice Wine: A Novel Brewing Process. *Journal of Food Process Engineering*, *39*(6), 581-590.
- Yang, Y., Xia, Y., Lin, X., Wang, G., Zhang, H., Xiong, Z., Yu, H., Yu, J., & Ai, L. (2018). Improvement of flavor profiles in Chinese rice wine by creating fermenting yeast with

superior ethanol tolerance and fermentation activity. *Food Research International*, 108, 83-92.

Yousef, A. E., & Carlstrom, C. (2003). *Food microbiology : a laboratory manual*. Canada: John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.





ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

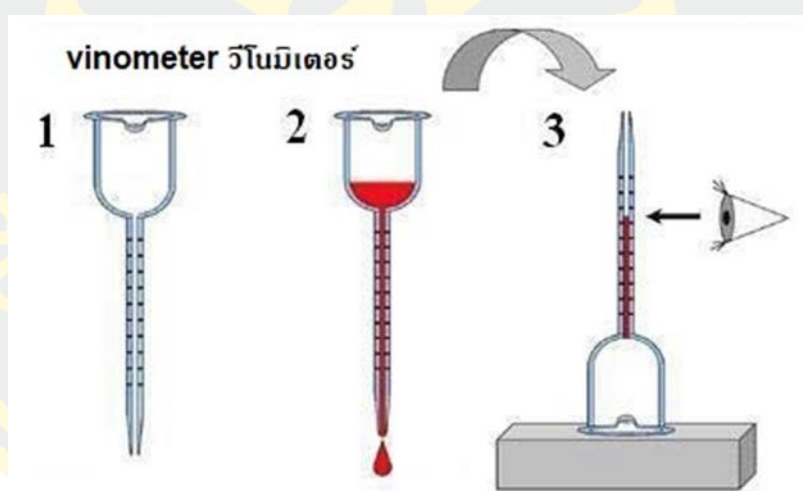
การวิเคราะห์ห้องค์ประกอบทางเคมี

ก-1 การวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) (Hsieh et al., 2013)

นำตัวอย่าง 30 มิลลิลิตร ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดค่า pH โดยใช้เครื่อง pH meter

ก-2 การวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์โดยใช้ Vinometer (Wendt, 2012)

1. นำตัวอย่างประมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่ใน Vinometer แล้วรอให้ตัวอย่างหยุดออกจาก Vinometer
2. คำนวณ Vinometer แล้วสังเกตตัวอย่างที่ไหลลงมา เมื่อหยุดแล้วทำการอ่านค่าที่ได้



ภาพที่ ก-1 วิธีการใช้ Vinometer

ที่มา : ก. พนิต (2563)

ก-3 การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดโดยใช้ Hand refractometer (Li et al., 2014)

ทำการหยดตัวอย่าง 1-2 หยด ลงในเครื่อง Hand refractometer เมื่อปิดฝาให้สนิท ตัวอย่างจะแผ่ราบตามแผ่นกระจก มีชิงให้แสงตกกระทบตัวอย่างแล้วหักเหไปปรากฏเป็นแถบมืดและแถบสว่างบนสเกล ในการอ่านค่าสเกลให้อ่านตรงรอบต่อแถบมืดกับแถบสว่าง

ก-4 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Hsieh et al., 2013)

1. เตรียม Folin-Ciocalteu's phenol reagent ร้อยละ 10 โดยปริมาตร

ปีเปตสาร Folin-Ciocalteu's phenol reagent ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

2. เตรียม Sodium carbonate (Na_2CO_3) ร้อยละ 7.5 (น้ำหนักต่อปริมาตร)

ชั่ง sodium carbonate 7.5 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

3. เตรียมกรดแกลลิก 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ชั่งกรดแกลลิก ปริมาณ 0.01xx กรัม แล้วละลายด้วยน้ำกลั่น ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

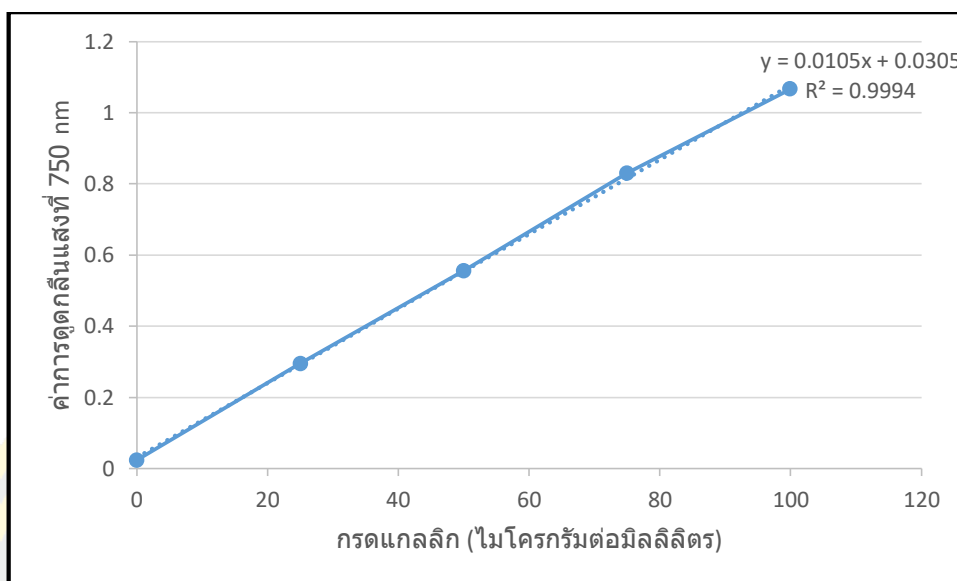
4. กราฟมาตรฐานกรดแกลลิก

1. ปีเปตกรดแกลลิก 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0, 2.5, 5.0, 7.5 และ 10 มิลลิลิตร ใส่ขวดปรับปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น จะได้กรดแกลลิกความเข้มข้น 0, 25, 50, 75 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2. นำกรดแกลลิกแต่ละความเข้มข้นประมาณ 0.2 มิลลิลิตร ผสมกับสาร Folin-Ciocalteu's phenol reagent ร้อยละ 10 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที

3. จากนั้นเติม Na_2CO_3 ร้อยละ 7.5 ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

4. นำค่าที่ได้มาทำกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก



ภาพที่ ก-1 กราฟมาตรฐานกรดแกลลิก

5. วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

แทนสารมาตรฐานกรดแกลลิกด้วยตัวอย่าง แล้วทำตามข้อที่ 2 และ 3 จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก

ก-5 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Hsieh et al., 2013)

1. เตรียม 2mM DPPH

ชั่ง DPPH ปริมาณ 0.0789 กรัม ละลายในเมทานอล แล้วใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยเมทานอล

2. วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

1. นำตัวอย่าง 2 มิลลิลิตร ผสมกับ 2mM DPPH ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที

2. จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้เมทานอลเป็นตัวอย่างควบคุม แล้วคำนวณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากสูตร

$$\text{ร้อยละความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ} = \frac{A_{\text{ตัวอย่างควบคุม}} - A_{\text{ตัวอย่าง}}}{A_{\text{ตัวอย่างควบคุม}}} \times 100$$

ก-6 การวิเคราะห์ฤทธิ์การยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ Xanthine Oxidase (XO) (Rahmani et al., 2019)

1. เตรียม 70 mM phosphate buffer (pH=7.5)

1. เตรียม 70 mM KH_2PO_4 โดยชั่ง KH_2PO_4 ปริมาณ 9.53 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร จากนั้นปรับให้ได้ 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

2. เตรียม 70 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ โดยชั่ง $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ปริมาณ 12.46 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

3. นำสารจากข้อ 1 และ 2 มาผสมกันให้ได้ pH เท่ากับ 7.5

2. เตรียม 150 μM xanthine

ชั่ง xanthine ปริมาณ 0.0023 กรัม ละลายด้วย 1 M NaOH แล้วใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วย 1 M NaOH

3. เตรียม 15 $\mu\text{g/ml}$ allopurinol

ชั่ง allopurinol ปริมาณ 0.0015 กรัม ละลายด้วย 1 M NaOH แล้วใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วย 1 M NaOH

4. วิเคราะห์ฤทธิ์การยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ Xanthine Oxidase (XO)

1. ปิเปิดตัวอย่าง 500 ไมโครลิตร ผสมกับ 70 mM phosphate buffer (pH=7.5) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร

2. เติมเอนไซม์ Xanthine Oxidase ปริมาตร 8.77 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มนาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

3. เติม 150 μM xanthine ปริมาตร 600 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มนาน 5 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร โดย blank คือ ตัวอย่างที่ไม่มีการเติมเอนไซม์ Xanthine Oxidase

4. คำนวณการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ Xanthine Oxidase (XO) จาก

$$\% \text{ การยับยั้ง} = [(A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{blank}}] \times 100$$

ก-7 การวิเคราะห์ปริมาณโมนาโคลิน เอ (Wang et al., 2004)

1. นำตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร มาสกัดด้วย ethyl acetate ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง

2. จากนั้นนำมากรองผ่านกระดาษกรอง (whatman) เบอร์ 1

3. เติม 1% trifluoroacetic acid ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพื่อให้เกิด lactonization ของสาร โมนาโคลิน เค
4. นำมาระเหยให้แห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ
5. หลังจากนั้นเติม acetonitrile (HPLC grade) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อละลายสาร โมนาโคลิน เค แล้วนำไปกรองผ่านตัวกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร และนำไปวิเคราะห์ HPLC
6. วิเคราะห์สาร โมนาโคลิน เค ด้วย HPLC ทำการโดยการการใช้คอลัมน์ C_{18} แล้วเฟสเคลื่อนที่คือ acetonitrile:0.5% phosphoric acid (65:35 v/v) อัตราการไหลเท่ากับ 0.7 ml/min และใช้ตัวตรวจวัดคือ UV ที่ความยาวคลื่น 238 นาโนเมตร

ก-8 การวิเคราะห์ปริมาณซิทรีนิน (Wang et al., 2014)

1. นำตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร มาสกัดด้วยสารละลาย EW (ethanol:water, 70:30, v/v) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แล้วนำไปอัลตราโซนิกที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที และนำไปเขย่าอีกครั้งที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นาน 1.5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส
2. จากนั้นนำไปกรองผ่านตัวกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วนำไปวิเคราะห์ซิทรีนินด้วย HPLC
3. ในการวิเคราะห์ด้วย HPLC โดยใช้คอลัมน์ C_{18} และเฟสเคลื่อนที่เป็น acetonitrile: น้ำ (ปรับ pH ให้ได้ 2.5 ด้วย H_3PO_4) (50:50 v/v) อัตราการไหลเท่ากับ 1.0 ml/min และใช้ตัวตรวจวัดคือ fluorescence ใช้ excitation และ emission ที่ความยาวคลื่น 331 และ 500 นาโนเมตร ตามลำดับ

ก-9 การวิเคราะห์ปริมาณรงควัตถุ (Johns & Stuart, 1991)

วิเคราะห์ปริมาณรงควัตถุ โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความเข้มแสง 400, 470 และ 500 นาโนเมตร สำหรับรงควัตถุสีเหลือง ส้ม และแดง ตามลำดับ

1. วิธีการวิเคราะห์

1. นำตัวอย่าง 1 กรัม มาสกัดด้วยสารละลายเอทานอลความเข้มข้น 70% ปริมาตร 40 มิลลิลิตร แล้วนำไป shaking ประมาณ 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง
3. จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วกลั่นด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

4. นำตัวอย่างไปวิเคราะห์ปริมาณรงควัตถุด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 400, 470 และ 500 นาโนเมตร โดยใช้เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 สำหรับเป็น blank แล้วนำค่าที่ได้คำนวณดังสมการ

$$\text{Pigment concentrations} = \frac{\text{ODnm} \times \text{Dilution factor} \times \text{Volume of alcohol (50 ml)}}{\text{Weight of sample}}$$

(OD units/g)

ก-10 การวิเคราะห์ปริมาณกรดอะซิติก

1. การเตรียมสารเคมี

1. 0.1 M NaOH โดยชั่ง NaOH 0.4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

2. Phenolphthalein ร้อยละ 1: ชั่ง phenolphthalein 1 กรัม ลงใน beaker ขนาด 10 มิลลิลิตร ละลายด้วย ethanol ร้อยละ 95 แล้วถ่ายลงใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วย ethanol ร้อยละ 95

2. วิธีการดำเนินการวิเคราะห์

1. นำตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Phenolphthalein ร้อยละ 1 จำนวน 3 หยด

2. ไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐาน 0.1 M NaOH จนถึงจุดยุติ (สีชมพู)

3. บันทึกปริมาตรสารละลาย 0.1 M NaOH ที่ใช้

4. คำนวณปริมาณกรดอะซิติก โดยใช้สูตรคำนวณดังนี้

$$\text{ปริมาณกรดอะซิติก (g/100 ml)} = \frac{N \times V \times M.W}{10 \times \text{ปริมาตรของตัวอย่าง}}$$

เมื่อ N = ความเข้มข้นมาตรฐานของ 0.1 M NaOH

V = จำนวนมิลลิลิตรของสารละลายมาตรฐานของ 0.1 M NaOH

M.W = molecular weight ของกรดอะซิติก เท่ากับ 60.05

ก-11 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (AOAC, 2016)

1. วัสดุ และอุปกรณ์

1. ถ้วยโลหะสำหรับหาความชื้น (moisture can)

2. ตู้อบลมร้อน (hot air oven)

3. ภาชนะทำแห้ง (desiccator)

4. คีม (tongs)

5. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

2. วิธีดำเนินการวิเคราะห์

1. เตรียมถ้วยโลหะสำหรับหาความชื้น (พร้อมฝา) โดยล้างให้สะอาด นำไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ประมาณ 5 ชั่วโมงนำออกจากตู้อบโดยเก็บในภาชนะทำแห้ง ทิ้งให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้อง แล้วชั่งน้ำหนัก บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน

2. ชั่งตัวอย่างอาหารให้ได้น้ำหนักแน่นอนประมาณ 2 กรัม ใส่ในถ้วยโลหะสำหรับหาความชื้น

3. นำถ้วยโลหะสำหรับหาความชื้นที่มีตัวอย่างอาหาร และฝาลงเข้าตู้อบลมร้อน โดยไม่ต้องปิดฝา อบแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง

4. เมื่อครบ 5 ชั่วโมง ปิดฝาลงด้วยขณะที่ยังอยู่ในตู้อบ และนำถ้วยออกมาวางในภาชนะทำแห้งจนอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง นำไปชั่งน้ำหนัก

5. คำนวณหาปริมาณความชื้น โดยใช้สูตรคำนวณนี้

$$\text{ความชื้น (ร้อยละ)} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างที่หายไป} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้}}$$

ก-12 การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า (AOAC, 2016)

1. วัสดุ และอุปกรณ์

1. เบ้าพร้อมฝา (crucible+lid)

2. เตาเผา (muffle furnace)

3. ภาชนะทำแห้ง (desiccator)

4. แผ่นร้อน (hot plate)

5. กระดาษกรองชนิดปราศจากเถ้า (ashless filter-paper)

6. คีม (tongs)

7. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

2. วิธีดำเนินการวิเคราะห์

1. เตรียมเบ้าพร้อมฝา โดยล้างให้สะอาด นำไปเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส นานประมาณ 1 ชั่วโมง นำออกจากเตาเผาโดยเก็บในภาชนะทำแห้ง ทิ้งให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้องแล้วชั่งน้ำหนัก บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน

2. ชั่งตัวอย่างอาหารให้ได้น้ำหนักแน่นอนประมาณ 5 กรัม ใส่ในเบ้า

3. นำเข้าที่มีตัวอย่างอาหาร และฝาเข้าเตาเผา โดยไม่ต้องปิดฝา เเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้เถ้าที่เป็นสีเทาขาวหรือน้ำหนักที่ได้คงที่

4. นำเข้าออกมาวางในภาชนะทำแห้ง และปิดฝา ทิ้งไว้จนอุณหภูมิต่ำกว่า อุณหภูมิห้อง นำไปชั่งน้ำหนัก

5. กำหนดหาปริมาณเถ้า โดยใช้สูตรคำนวณนี้

$$\text{เถ้า (ร้อยละ)} = \frac{\text{น้ำหนักเถ้า}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้ น้ำหนักน้ำในตัวอย่าง}} \times 100$$

ก-13 การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (AOAC, 2016)

1. สารเคมี วัสดุอุปกรณ์ และเครื่องมือ

1. ปีโตรเลียมอีเทอร์ จุดเดือด 40-60 องศาเซลเซียส
2. เครื่องแก้ว เช่น กระจบอทดวง บีกเกอร์
3. กระจบดวยกรอง
4. ซ้อนตักสาร
5. เครื่องสกัดไขมัน (soxhlet extractor) และชุดอุปกรณ์ (Gerhardt)
6. เครื่องชั่งละเอียด (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง)

2. วิธีดำเนินการวิเคราะห์

1. นำตัวอย่างอาหาร และบีกเกอร์สำหรับชุดสกัดไขมัน ไปอบไล่ความชื้นที่ 105 องศาเซลเซียส ประมาณ 1-2 ชั่วโมง แล้วทำให้เย็นในโอบความชื้น
2. ชั่งตัวอย่างอาหาร 5 กรัม ด้วยเครื่องชั่งละเอียด บันทึกน้ำหนักที่ชั่งไว้ ห่อตัวอย่างอาหารด้วยกระจบดวยกรองที่ปราศจากไขมัน พับใส่ใน extraction thimble ระวังอย่าให้ตัวอย่างอาหารสามารถหลุดออกจากกระจบดวยกรองในขณะที่สกัดได้
3. ชั่งบีกเกอร์ด้วยเครื่องชั่งละเอียด บันทึกน้ำหนักไว้
4. เทปีโตรเลียมอีเทอร์ 140 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ นำ extraction thimble ประกอบเข้ากับ holder วางลงในบีกเกอร์ แล้วนำไปประกอบเข้ากับเครื่องสกัดไขมัน
5. เครื่องจะทำงานด้วยระบบอัด โนมติ เมื่อสกัดเสร็จสมบูรณ์ทิ้งให้เย็นสักครู่ จึงนำบีกเกอร์ออกจากเครื่องสกัด
6. นำบีกเกอร์ไปไล่ปีโตรเลียมอีเทอร์ที่ยังคงค้างอยู่ออก โดยวางบีกเกอร์ในน้ำต้มเดือด (ควรทำในตู้ดูดควัน) เมื่อปีโตรเลียมอีเทอร์แห้งสนิท นำบีกเกอร์ไปอบในตู้อบลมร้อนที่

อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทั้งให้เขียนในโถอบความชื้น นำบีกเกอร์ออกมาชั่งน้ำหนัก ด้วยเครื่องชั่งละเอียด บันทึกน้ำหนักที่ได้

7. กำหนดหาปริมาณไขมัน โดยใช้สูตรคำนวณนี้

$$\text{ไขมัน (ร้อยละ)} = \frac{\text{น้ำหนักบีกเกอร์ครั้งหลัง} - \text{น้ำหนักบีกเกอร์ครั้งแรก}}{\text{น้ำหนักสารตัวอย่าง}} \times 100$$

ก-14 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (AOAC, 2016)

1. วัสดุอุปกรณ์

1. เครื่อง digestion unit B-424 (Buchi)
2. เครื่อง scrubber B-414 (Buchi)
3. เครื่อง distillation unit B-324 (Buchi)
4. digestion tube
5. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 150 และ 250 มิลลิลิตร
6. บิวเรต ขนาด 50 มิลลิลิตร
7. ปิเปต ขนาด 25 มิลลิลิตร
8. กระจกตวง ขนาด 50 มิลลิลิตร
9. ขวดปรับปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 100 และ 500 มิลลิลิตร
10. บีกเกอร์ ขนาด 50, 100 และ 1000 มิลลิลิตร
11. แท่งแก้วคนสาร
12. เครื่องชั่ง (ถึงทศนิยมตำแหน่งที่ 4 = ละเอียดถึง 0.1 มิลลิกรัม)
13. กระจกชั่งสาร และช้อนตักสาร

2. สารเคมี

ขั้นตอนการย่อย

1. คะตะลิสต์ CuSO_4 ผสมกับ K_2SO_4 (อัตราส่วน 0.5:10) เตรียมโดยการชั่ง CuSO_4 5 กรัม กับ K_2SO_4 100 กรัม นำสารทั้งสองมาผสมกัน

2. กรดซัลฟูริก (H_2SO_4) เข้มข้น

ขั้นตอนการกลั่น และการไตเตรต

1. boric acid ร้อยละ 2 น้ำหนักต่อปริมาตร (เตรียม 500 มิลลิลิตร โดยชั่ง boric acid 10 กรัม ลงในบีกเกอร์แล้วเติมน้ำกลั่นให้ถึงขีด 500 มิลลิลิตร ของบีกเกอร์) เทใส่ในถังเก็บสารละลายบอริกข้าง ๆ เครื่อง distillation unit

2. NaOH ร้อยละ 32 น้ำหนักต่อปริมาตร (เตรียม 1 ลิตร โดยชั่ง NaOH 320 กรัม ลงใน บีกเกอร์แล้วเติมน้ำกลั่นให้ถึงขีด 1000 มิลลิลิตร ของบีกเกอร์) เทใส่ในถังเก็บสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ข้าง ๆ เครื่อง distillation unit

3. น้ำกลั่น

4. Titration solution ได้แก่ 0.2 N HCl เตรียมโดยการนำกรด HCl เข้มข้น 8.20 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร นำไปไตเตรทให้รู้ความเข้มข้นที่แท้จริงกับสารละลายมาตรฐาน

5. Sher indicator

การเตรียมเครื่องดักจับไอกรด

1. เตรียมโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ปริมาณ 600 กรัม (ใช้แบบ commercial drade) ละลายในน้ำกลั่น 1.8 ลิตร

2. จากนั้นเติมอินดิเคเตอร์โบรโมไทมอลบลูประมาณ 0.1 กรัม (ปลายช้อน spatula) จะได้สารละลายสีน้ำเงิน เมื่อใช้ไปจะมีหมดฤทธิ์ต่างที่จะสะเทินกรดได้ โดยจะสังเกตเห็นสารละลายนี้เปลี่ยนเป็นสีเขียวให้เปลี่ยนสารละลายใหม่ อนึ่งเมื่อเทสารละลายนี้ใส่ในอ่างแก้วให้ระดับต่ำกว่าขีดที่กำหนดประมาณ 1 นิ้ว

3. วิธีดำเนินการวิเคราะห์

1. ส่วน Scrubber Unit เปิด cooling bath ก่อนการย่อยประมาณ 1 ชั่วโมง (อุณหภูมิต่ำกว่า 12 องศาเซลเซียส) เปิดวาล์วน้ำเข้าส่วน condenser

2. ส่วน Digestion Unit ชั่งตัวอย่างแห้งหนักประมาณ 1.5 กรัม ลงใน digestion tube

3. เติมอะลูมิเนียม 10 กรัม

4. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 25 มิลลิลิตร

5. แล้วประกอบ Digestion tube เข้าเครื่อง Digestion Unit

6. ประกอบส่วนของ Digestion Unit เข้ากับ Scrubber Unit เปิดปุ่ม main switch ทั้ง 2 เครื่อง และปรับระดับความร้อนของเครื่อง Digestion Unit ไปที่ No. 5 นาน 5 นาที แล้วปรับเป็น No. 9 เริ่มจับเวลาในการย่อยประมาณ 50 นาที จนสารละลายใส แล้วปิดเฉพาะเครื่อง Digestion Unit และตั้งทิ้งไว้จนเย็นประมาณ 25-30 นาที (เครื่อง Scrubber Unit เปิดทิ้งไว้จน digestion tube เย็น) หากทิ้งไว้นานสารละลายที่ได้อาจกลายเป็นผลึกซึ่งยังคงนำไปกลั่นในขั้นต่อไปได้

7. นำ digestion tube ที่ผ่านการย่อยมาประกอบในเครื่อง Distillation Unit แล้วตั้งคำสั่งระบบดิจิทัล โดยกำหนด เติม H_2O : conc. H_2SO_4 ที่ใช้ = 5 : 1 และเติม NaOH ร้อยละ 32 น้ำหนักต่อปริมาตร : conc. H_2SO_4 ที่ใช้ = 4-5 : 1

8. การเติม NaOH จะต้องเติมให้สารละลายทั้งหมดเป็นด่างมากเกินพอโดยจะมีสีน้ำตาลดำหรือบางครั้งอาจเป็นสีฟ้า-น้ำเงินเข้ม หากยังเป็นสีขาวใสให้กดปุ่มเติม NaOH ที่หน้าจอจนเป็นสีน้ำตาลดำ

9. นำขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร มาประกอบในเครื่อง Distillation Unit แล้วตั้งคำสั่งของสถานะในการกลั่น โดยกำหนด สารละลาย boric acid ร้อยละ 2 น้ำหนักต่อปริมาตร 60 มิลลิลิตร ใส่ Sher indicator 3 หยด

10. กลั่นเป็นเวลา 3 นาที แล้วไตเตรทสารละลายที่กลั่นได้กับสารละลายกรด HCl เจือจาง จนถึงจุดยุติ โดยสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเขียวอ่อน-เข้มไปเป็นสีเทาฟ้าจาง ๆ หรือใสไม่มีสี หากเป็นสีส้มจาง ๆ แสดงว่าเลยจุดยุติไปแล้ว บันทึกปริมาตรของ HCl ที่ใช้

11. คำนวณหาปริมาณโปรตีน โดยใช้สูตรคำนวณนี้

$$\text{Nitrogen (ร้อยละ)} = \frac{\text{N of HCl} \times \text{Vol. of HCl} \times 1.4 \times 100}{\text{Weight of dry sample}}$$

$$\text{Protein (ร้อยละ)} = \text{Nitrogen (ร้อยละ)} \times F$$

โดย N of HCl = ความเข้มข้นของ HCl เจือจางที่ใช้ในการไตเตรท หน่วยเป็น N (Normality)

Vol. of HCl = ปริมาตรของ HCl เจือจางที่ใช้ในการไตเตรท (มิลลิลิตร)

F = Protein factor

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์

ข-1 การวิเคราะห์จำนวนยีสต์ และราโดยใช้วิธี Spread plate (Yousef & Carlstrom, 2003)

1. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. เตรียม potato dextrose agar (PDA) โดยชั่ง PDA 39 กรัม ละลายในน้ำ 1000 มิลลิลิตร แล้วต้มให้เดือด จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที
2. เตรียม tartaric acid โดยชั่ง tartaric acid ปริมาณ 10 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วใส่ในขวดปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น
3. ทิ้ง PDA ให้เย็น (ประมาณ 48 °C) จากนั้นนำ tartaric acid ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วมาผสมกับ PDA โดย tartaric acid ปริมาตร 1.85 มิลลิลิตร ผสมกับ PDA ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วทำการเทเพลาท แล้วทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง

2. วิธีการดำเนินการวิเคราะห์

1. ปิเปิดตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ในสารละลาย NaCl ร้อยละ 0.85 ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จะได้ตัวอย่างเจือจาง 1:10
2. ปิเปิดตัวอย่างที่เจือจาง 1:10 มา 1 มิลลิลิตร ใส่ในสารละลาย NaCl ร้อยละ 0.85 ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จะได้ตัวอย่างเจือจาง 1:100 ทำเช่นนี้ต่อไปจนได้ตัวอย่างที่เจือจางตามต้องการ
3. ปิเปิดตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 1:10 หรืออื่นๆ ตามความเหมาะสม 0.1 มิลลิลิตร ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ ระดับความเจือจางละ 3 จานเพาะเชื้อ ใช้แท่งแก้วอเกลีย์ให้ทั่วจนกระทั่งผิวหน้าของวุ้นแห้ง
6. บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 4-5 วัน โดยไม่ต้องคว่ำจานเพาะเชื้อ
7. นับจำนวนโคโลนีในจานเพาะเชื้อที่มีเชื้อเจริญ 25-250 โคโลนี (ในกรณีที่มีปริมาณราจำนวนมาก จำนวนโคโลนีสูงสุดที่เหมาะสมในการนับอาจน้อยกว่า 150 โคโลนี) แล้วคำนวณจากสูตร

$$\text{จำนวนยีสต์หรือรา (CFU/ml)} = \frac{\text{ค่าเฉลี่ยโคโลนีที่นับได้}}{\text{ระดับความเจือจาง} \times \text{ปริมาตรตัวอย่าง}}$$

ข-2 การวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียกรดอะซิติกโดยใช้วิธี spread plate (Li et al., 2014; Yousef & Carlstrom, 2003)

1. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. ชั่ง glucose, yeast extract และ agar ปริมาณ 100, 10 และ 20 กรัม ตามลำดับ ละลายในน้ำ 1000 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มให้เดือด จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อ
2. ชั่ง CaCO_3 ปริมาณ 10 กรัม ใส่ในหลอดทดลอง แล้วนำไปฆ่าเชื้อ
3. ทิ้งให้อาหารเย็น (ประมาณ 48 องศาเซลเซียส) แล้วผสม CaCO_3 กับอาหารเลี้ยงเชื้อ
4. เทเพลา แล้วทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง

2. วิธีการดำเนินการวิเคราะห์

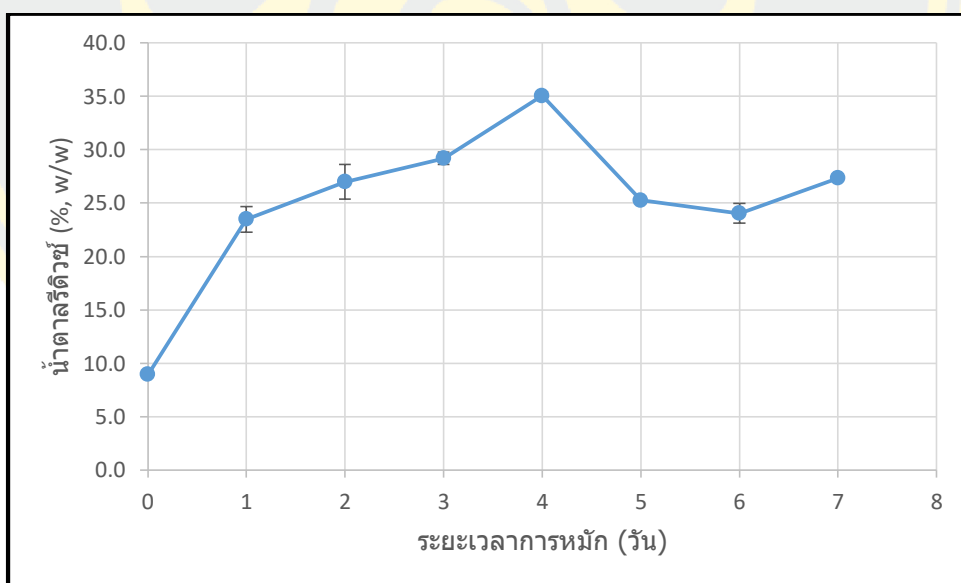
1. ปิเปตตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ในสารละลายสำหรับเจือจาง 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จะได้ตัวอย่างเจือจาง 1:10
2. ปิเปตตัวอย่างที่เจือจาง 1:10 มา 1 มิลลิลิตร ใส่ในสารละลายสำหรับเจือจาง 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จะได้ตัวอย่างเจือจาง 1:100 ทำเช่นนี้ต่อไปจนได้ตัวอย่างที่เจือจางตามต้องการ
3. ปิเปตตัวอย่างที่ระดับความเจือจางที่เหมาะสมปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อระดับเจือจางละ 2 จานเพาะเชื้อ ใช้แท่งแก้วอเกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วจนกระทั่งผิวหน้าวุ่นแห้ง
5. บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง
6. นับจำนวน โคโลนีในจานเพาะเชื้อทุกโคโลนีที่อยู่ในช่วง 30-300 โคโลนี คำนวณจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดจากสูตร

$$\text{จำนวนแบคทีเรียกรดอะซิติก (CFU/ml)} = \frac{\text{จำนวนโคโลนีที่นับได้}}{\text{ระดับความเจือจาง} \times \text{ปริมาตรตัวอย่าง (0.1 ml)}}$$

ภาคผนวก ค

ค-1 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของผลพลอยได้พาสตาข้าวเจ้าที่หมักด้วย *A. rouxii* TISTR 3182

นำผลพลอยได้พาสตาข้าวเจ้ามาหมักด้วยเชื้อรา *A. rouxii* TISTR 3182 เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์ในระหว่างการหมัก โดยเริ่มจากซังผลพลอยได้พาสตาข้าวเจ้า 10 กรัม ใสในงานเพาะเลี้ยงเชื้อ จากนั้นเติมน้ำ 10 มิลลิลิตร เพื่อปรับให้ความชื้นเริ่มต้น ได้มีค่าประมาณร้อยละ 47 ซึ่งเป็นสภาวะความชื้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *A. rouxii* (Dung et al., 2005) ทำการคลุกให้เข้ากัน แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งไว้ในเย็น จากนั้นเติมสารละลายสปอร์ของ *A. rouxii* TISTR 3182 ปริมาตรร้อยละ 10 (ปริมาตรค่อน้ำหนัก) หรือ 1 มิลลิลิตร (Daroonpunt et al., 2016) เกลี่ยสารละลายสปอร์ให้ทั่วอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่า น้ำตาลรีดิวซ์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นระหว่างการหมักจาก 0-4 วัน และลดลงจากวันที่ 4-7 วันของการหมัก โคจิจผลพลอยได้พาสตาข้าวเจ้ามีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดคือร้อยละ 35.05 (โดยน้ำหนัก) เมื่อหมักนาน 4 วัน



ภาพที่ ค-1 การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์ของผลพลอยได้พาสตาข้าวเจ้าในระหว่างการหมักด้วยเชื้อรา *A. rouxii* TISTR 3182

ภาคผนวก ง

ง-1 แบบประเมินทางประสาทสัมผัส วิธี scoring test

หัวข้อวิทยานิพนธ์เรื่อง : ผลของสายพันธุ์ยีสต์และแบคทีเรียกรดอะซิติกต่อการผลิตของ
น้ำส้มสายชูจากผลพลอยได้พาสตาข้าวเจ้าและข้าวแดง

ลำดับที่ของผู้ทดสอบ..... วันที่ทดสอบ.....

ผลิตภัณฑ์.....

คำชี้แจง กรุณาทดสอบตัวอย่างจากซ้ายไปขวาและให้คะแนนความเข้มข้นในด้านสีแดง ความขุ่น กลิ่น
แอลกอฮอล์ กลิ่นผลไม้ กลิ่นข้าว รสหวาน รสเปรี้ยว รสขม และความฝาด ทำการทดสอบโดยการ
มอง การดมกลิ่น และการชิม (ไม่จำเป็นต้องกลืนถ้าไม่ต้องการ) แล้วให้คะแนนตามความหมายที่
กำหนด

กำหนดให้ 0 หมายถึง ไม่มี 1 หมายถึง เข้มน้อยที่สุด 2 หมายถึง เข้มน้อย
3 หมายถึง เข้มปานกลาง 4 หมายถึง เข้มมาก 5 หมายถึง เข้มมากที่สุด

รหัสตัวอย่าง
สีแดง
ความขุ่น
กลิ่นแอลกอฮอล์
กลิ่นผลไม้
กลิ่นข้าว
รสหวาน
รสเปรี้ยว
รสขม
ความฝาด

ข้อเสนอแนะ

.....

.....

.....

ขอขอบพระคุณในความร่วมมือของท่าน

วิธีทดสอบทางประสาทสัมผัส

การประเมินทางประสาทสัมผัสดำเนินการโดยผู้ทดสอบ 10 คน ที่ผ่านการฝึกฝน มีการเลือกลักษณะทางประสาทสัมผัสทั้งหมด 9 ลักษณะ ได้แก่ ลักษณะปรากฏ (สี และความขุ่น) กลิ่น (แอลกอฮอล์ ผลไม้ และข้าว) รสชาติ (หวาน เปรี้ยว และขม) และความรู้สึกลงในปาก (ความฝาด) ผู้ทดสอบจะถูกฝึกฝนโดยตัวอย่างอ้างอิงในตารางที่ ๖-1 ซึ่งแบ่งตัวอย่างอ้างอิงเป็น 3 ระดับ คือ ระดับต่ำสุด กลาง และสูงสุด การฝึกอบรมสิ้นสุดลงเมื่อคะแนนความเข้มข้นด้านลักษณะทางประสาทสัมผัสของผู้ทดสอบใกล้เคียงกัน

การประเมินทางประสาทสัมผัสจะดำเนินการในห้องที่มีแสงสม่ำเสมอ ไม่มีเสียงรบกวน และสิ่งเร้าที่ทำให้เสียสมาธิ ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ตัวอย่างไวน์โคจิจ้าวแดงที่เจือจางให้มีแอลกอฮอล์ร้อยละ 6 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ใส่ในแก้วที่ติดตัวเลขแบบสุ่ม มีการเตรียมน้ำดื่มให้กับผู้ทดสอบเพื่อทำความสะอาดปากในระหว่างชิมตัวอย่างแต่ละตัวอย่าง ใช้สเกล 0-5 ในการทดสอบ

ตารางที่ ง-1 รายละเอียด และสเกลอ้างอิงของลักษณะทางประสาทสัมผัสในตัวอย่างไวน์โคจิจ้าวแดง

ลักษณะทางประสาทสัมผัส	รายละเอียด	สเกลอ้างอิง
ลักษณะปรากฏ		
สี	ตั้งเกิดสี	ไม่มีตัวอย่าง
ความขุ่น	ระดับความขุ่น	ไม่มีตัวอย่าง
กลิ่น		
กลิ่นแอลกอฮอล์	กลิ่นที่เกี่ยวข้องกับแอลกอฮอล์	ต่ำสุด: น้ำ; กลาง: เอทานอลร้อยละ 12.5; สูงสุด: เอทานอลร้อยละ 25
กลิ่นผลไม้	กลิ่นจากผลไม้ เช่น กล้วย	ต่ำสุด: น้ำ; กลาง: เนื้อกล้วย 7.5 กรัมต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร; สูงสุด: เนื้อกล้วย 15 กรัมต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร
กลิ่นข้าว	กลิ่นที่เกี่ยวข้องกับข้าวหรือบาร์เลย์	ต่ำสุด: น้ำ; กลาง: ข้าวสุก 2 กรัมต่อน้ำ 20 มิลลิลิตร; สูงสุด: ข้าวสุก 4 กรัมต่อน้ำ 20 มิลลิลิตร
รสชาติ		
รสหวาน	รสชูโครส	ต่ำสุด: น้ำ; กลาง: ชูโครสร้อยละ 3; สูงสุด: ชูโครสร้อยละ 6
รสเปรี้ยว	รสน้ำส้มสายชู	ต่ำสุด: น้ำ; กลาง: น้ำส้มสายชู 0.1 มิลลิลิตรต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร; สูงสุด: น้ำส้มสายชู 0.2 มิลลิลิตรต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร
รสขม	รสคาเฟอีน	ต่ำสุด: น้ำ; กลาง: คาเฟอีนร้อยละ 0.05; สูงสุด: คาเฟอีนร้อยละ 0.1
ความรู้สึกในปาก		
ความฝาด	ความรู้สึกปากแห้ง	ไม่มีตัวอย่าง

ที่มา : Yang et al. (2018)

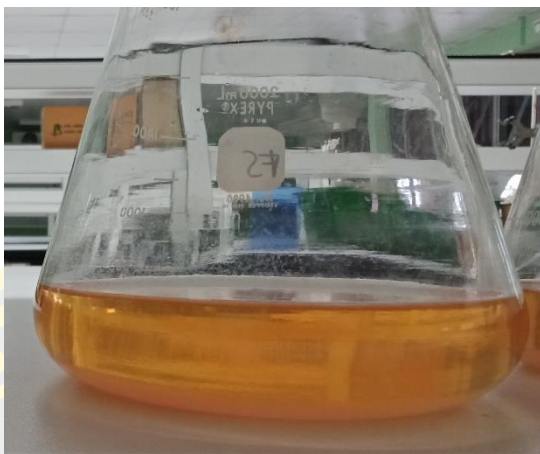
ภาคผนวก จ



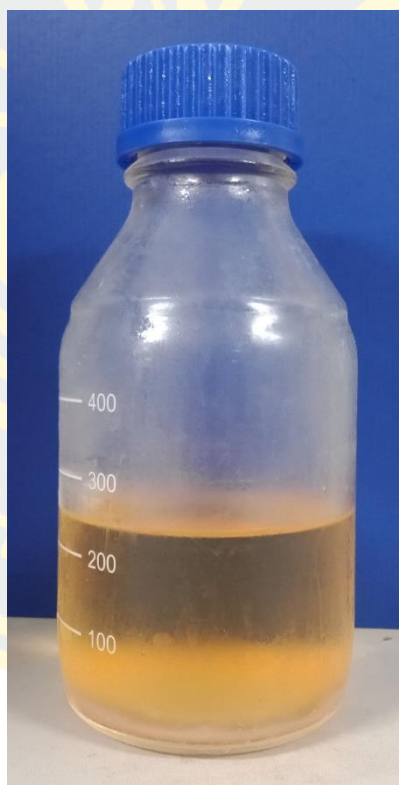
ภาพที่ จ-1 ไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5169 (S5169), 5196 (S5196) และ 5197 (S5197) ในวันที่ 0



ภาพที่ จ-2 ไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5169 (S5169), 5196 (S5196) และ 5197 (S5197) ในวันสุดท้ายของการหมัก (14 วัน)



ภาพที่ จ-3 น้ำส้มสายชูโคจิข้าวแดงที่หมักด้วย *Acetobacter pasteurianus* TISTR 102 ในวันสุดท้ายของการหมัก (39 วัน)



ภาพที่ จ-4 น้ำส้มสายชูโคจิข้าวแดงที่หมักด้วย *Acetobacter pasteurianus* TISTR 102 หลังตกตะกอนในตู้เย็น

ภาคผนวก ฉ

ตารางแสดงผลวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ตารางที่ ฉ-1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนจำนวนยีสต์ของตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย

Saccharomyces cerevisiae TISTR 5169 (S5169)

SOV	df	SS	MS	F	P
Treatment	7	54.790	7.827	30.400	0.000
Error	8	2.059	0.257		
Total	15	59.850			

ตารางที่ ฉ-2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนจำนวนยีสต์ของตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย

Saccharomyces cerevisiae TISTR 5196 (S5196)

SOV	df	SS	MS	F	P
Treatment	7	34.872	4.982	21.020	0.000
Error	8	1.896	0.237		
Total	15	36.768			

ตารางที่ ฉ-3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนจำนวนยีสต์ของตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย

Saccharomyces cerevisiae TISTR 5197 (S5197)

SOV	df	SS	MS	F	P
Treatment	7	40.997	5.857	9.890	0.002
Error	8	4.740	0.593		
Total	15	45.737			

ตารางที่ ฉ-4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนจำนวนยีสต์ วันที่ 0 ของตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5169 (S5169), 5196 (S5196) และ 5197 (S5197)

SOV	df	SS	MS	F	P
Treatment	2	0.019	0.010	0.040	0.961
Error	3	0.705	0.235		
Total	5	0.724			

ตารางที่ ฉ-5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนจำนวนยีสต์ วันที่ 2 ของตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดงที่หมัก
ด้วย *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5169 (S5169), 5196 (S5196) และ 5197 (S5197)

SOV	df	SS	MS	F	P
Treatment	2	0.003	0.002	0.000	0.997
Error	3	1.543	0.514		
Total	5	1.546			

ตารางที่ ฉ-6 การวิเคราะห์ความแปรปรวนจำนวนยีสต์ วันที่ 4 ของตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดงที่หมัก
ด้วย *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5169 (S5169), 5196 (S5196) และ 5197 (S5197)

SOV	df	SS	MS	F	P
Treatment	2	2.866	1.433	2.720	0.212
Error	3	1.581	0.527		
Total	5	4.447			

ตารางที่ ฉ-7 การวิเคราะห์ความแปรปรวนจำนวนยีสต์ วันที่ 6 ของตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดงที่หมัก
ด้วย *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5169 (S5169), 5196 (S5196) และ 5197 (S5197)

SOV	df	SS	MS	F	P
Treatment	2	1.593	0.797	1.960	0.286
Error	3	1.222	0.407		
Total	5	2.815			

ตารางที่ ฉ-8 การวิเคราะห์ความแปรปรวนจำนวนยีสต์ วันที่ 8 ของตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดงที่หมัก
ด้วย *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5169 (S5169), 5196 (S5196) และ 5197 (S5197)

SOV	df	SS	MS	F	P
Treatment	2	1.864	0.932	1.440	0.364
Error	3	1.941	0.647		
Total	5	3.805			

ตารางที่ ฉ-9 การวิเคราะห์ความแปรปรวนจำนวนยีสต์ วันที่ 10 ของตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5169 (S5169), 5196 (S5196) และ 5197 (S5197)

SOV	df	SS	MS	F	P
Treatment	2	8.874	4.437	7.780	0.065
Error	3	1.711	0.570		
Total	5	10.585			

ตารางที่ ฉ-10 การวิเคราะห์ความแปรปรวนจำนวนราของตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5169 (S5169)

SOV	df	SS	MS	F	P
Treatment	7	7.313	1.045	1.030	0.480
Error	8	8.148	1.019		
Total	15	15.461			

ตารางที่ ฉ-11 การวิเคราะห์ความแปรปรวนจำนวนราของตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5196 (S5196)

SOV	df	SS	MS	F	P
Treatment	7	6.672	0.953	1.040	0.474
Error	8	7.349	0.919		
Total	15	14.020			

ตารางที่ ฉ-12 การวิเคราะห์ความแปรปรวนจำนวนราของตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5197 (S5197)

SOV	df	SS	MS	F	P
Treatment	7	2.247	0.321	0.400	0.879
Error	8	6.451	0.806		
Total	15	8.698			

ตารางที่ ฉ-13 การวิเคราะห์ความแปรปรวนจำนวนรา วันที่ 0 ของตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดงที่หมัก
ด้วย *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5169 (S5169), 5196 (S5196) และ 5197 (S5197)

SOV	df	SS	MS	F	P
Treatment	2	0.858	0.429	9.410	0.051
Error	3	0.137	0.046		
Total	5	0.995			

ตารางที่ ฉ-14 การวิเคราะห์ความแปรปรวนจำนวนรา วันที่ 2 ของตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดงที่หมัก
ด้วย *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5169 (S5169), 5196 (S5196) และ 5197 (S5197)

SOV	df	SS	MS	F	P
Treatment	2	0.423	0.211	0.310	0.756
Error	3	2.059	0.686		
Total	5	2.481			

ตารางที่ ฉ-15 การวิเคราะห์ความแปรปรวนจำนวนรา วันที่ 4 ของตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดงที่หมัก
ด้วย *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5169 (S5169), 5196 (S5196) และ 5197 (S5197)

SOV	df	SS	MS	F	P
Treatment	2	0.079	0.039	0.100	0.910
Error	3	1.209	0.403		
Total	5	1.288			

ตารางที่ ฉ-16 การวิเคราะห์ความแปรปรวนจำนวนรา วันที่ 6 ของตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดงที่หมัก
ด้วย *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5169 (S5169), 5196 (S5196) และ 5197 (S5197)

SOV	df	SS	MS	F	P
Treatment	2	0.538	0.269	0.150	0.870
Error	3	5.539	1.846		
Total	5	6.077			

ตารางที่ ฉ-17 การวิเคราะห์ความแปรปรวนจำนวนรา วันที่ 8 ของตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดงที่หมัก
ด้วย *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5169 (S5169), 5196 (S5196) และ 5197 (S5197)

SOV	df	SS	MS	F	P
Treatment	2	1.586	0.793	0.460	0.671
Error	3	5.202	1.734		
Total	5	6.789			

ตารางที่ ฉ-18 การวิเคราะห์ความแปรปรวนจำนวนรา วันที่ 10 ของตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดงที่หมัก
ด้วย *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5169 (S5169), 5196 (S5196) และ 5197 (S5197)

SOV	df	SS	MS	F	P
Treatment	2	0.553	0.276	0.120	0.895
Error	3	7.207	2.402		
Total	5	7.759			

ตารางที่ ฉ-19 การวิเคราะห์ความแปรปรวนจำนวนรา วันที่ 12 ของตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดงที่หมัก
ด้วย *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5169 (S5169), 5196 (S5196) และ 5197 (S5197)

SOV	df	SS	MS	F	P
Treatment	2	0.766	0.383	4.330	0.131
Error	3	0.265	0.088		
Total	5	1.031			

ตารางที่ ฉ-20 การวิเคราะห์ความแปรปรวนจำนวนรา วันที่ 14 ของตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดงที่หมัก
ด้วย *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5169 (S5169), 5196 (S5196) และ 5197 (S5197)

SOV	df	SS	MS	F	P
Treatment	2	0.282	0.141	1.280	0.396
Error	3	0.330	0.110		
Total	5	0.612			

ตารางที่ จ-21 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่า pH ของตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย

Saccharomyces cerevisiae TISTR 5169 (S5169)

SOV	df	SS	MS	F	P
Treatment	7	0.065	0.010	1.310	0.355
Error	8	0.057	0.007		
Total	15	0.122			

ตารางที่ จ-22 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่า pH ของตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย

Saccharomyces cerevisiae TISTR 5196 (S5196)

SOV	df	SS	MS	F	P
Treatment	7	0.193	0.028	3.160	0.065
Error	8	0.070	0.009		
Total	15	0.263			

ตารางที่ จ-23 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่า pH ของตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย

Saccharomyces cerevisiae TISTR 5197 (S5197)

SOV	df	SS	MS	F	P
Treatment	7	0.093	0.013	1.04	0.470
Error	8	0.101	0.013		
Total	15	0.194			

ตารางที่ จ-24 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่า pH วันที่ 0 ของตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย

Saccharomyces cerevisiae TISTR 5169 (S5169), 5196 (S5196) และ 5197 (S5197)

SOV	df	SS	MS	F	P
Treatment	2	0.076	0.038	6.660	0.079
Error	3	0.017	0.006		
Total	5	0.093			

ตารางที่ ฉ-25 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่า pH วันที่ 2 ของตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5169 (S5169), 5196 (S5196) และ 5197 (S5197)

SOV	df	SS	MS	F	P
Treatment	2	0.003	0.002	0.120	0.888
Error	3	0.037	0.012		
Total	5	0.040			

ตารางที่ ฉ-26 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่า pH วันที่ 4 ของตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5169 (S5169), 5196 (S5196) และ 5197 (S5197)

SOV	df	SS	MS	F	P
Treatment	2	0.010	0.005	0.260	0.788
Error	3	0.060	0.020		
Total	5	0.071			

ตารางที่ ฉ-27 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่า pH วันที่ 6 ของตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5169 (S5169), 5196 (S5196) และ 5197 (S5197)

SOV	df	SS	MS	F	P
Treatment	2	0.002	0.001	0.050	0.955
Error	3	0.069	0.023		
Total	5	0.071			

ตารางที่ ฉ-28 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่า pH วันที่ 8 ของตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5169 (S5169), 5196 (S5196) และ 5197 (S5197)

SOV	df	SS	MS	F	P
Treatment	2	0.001	0.001	0.090	0.915
Error	3	0.020	0.007		
Total	5	0.021			

ตารางที่ ฉ-29 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่า pH วันที่ 10 ของตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5169 (S5169), 5196 (S5196) และ 5197 (S5197)

SOV	df	SS	MS	F	P
Treatment	2	0.009	0.004	0.780	0.532
Error	3	0.018	0.006		
Total	5	0.027			

ตารางที่ ฉ-30 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่า pH วันที่ 12 ของตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5169 (S5169), 5196 (S5196) และ 5197 (S5197)

SOV	df	SS	MS	F	P
Treatment	2	0.003	0.002	2.100	0.269
Error	3	0.002	0.001		
Total	5	0.006			

ตารางที่ ฉ-31 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่า pH วันที่ 14 ของตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5169 (S5169), 5196 (S5196) และ 5197 (S5197)

SOV	df	SS	MS	F	P
Treatment	2	0.006	0.003	2.590	0.222
Error	3	0.004	0.001		
Total	5	0.010			

ตารางที่ ฉ-32 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดของตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5169 (S5169)

SOV	df	SS	MS	F	P
Treatment	7	460.680	65.811	18.760	0.000
Error	8	28.060	3.508		
Total	15	488.740			

ตารางที่ จ-33 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดของตัวอย่างไวน์
โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5196 (S5196)

SOV	df	SS	MS	F	P
Treatment	7	202.760	28.966	8.750	0.003
Error	8	26.490	3.312		
Total	15	229.260			

ตารางที่ จ-34 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดของตัวอย่างไวน์
โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5197 (S5197)

SOV	df	SS	MS	F	P
Treatment	7	303.400	43.343	4.950	0.019
Error	8	70.020	8.752		
Total	15	373.420			

ตารางที่ จ-35 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด วันที่ 0 ของ
ตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5169 (S5169), 5196
(S5196) และ 5197 (S5197)

SOV	df	SS	MS	F	P
Treatment	2	0.042	0.021	0.810	0.523
Error	3	0.077	0.026		
Total	5	0.119			

ตารางที่ จ-36 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด วันที่ 2 ของ
ตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5169 (S5169), 5196
(S5196) และ 5197 (S5197)

SOV	df	SS	MS	F	P
Treatment	2	9.120	4.560	0.260	0.784
Error	3	51.900	17.300		
Total	5	61.020			

ตารางที่ จ-37 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด วันที่ 4 ของ ตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5169 (S5169), 5196 (S5196) และ 5197 (S5197)

SOV	df	SS	MS	F	P
Treatment	2	27.610	13.807	2.950	0.195
Error	3	14.020	4.673		
Total	5	41.630			

ตารางที่ จ-38 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด วันที่ 6 ของ ตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5169 (S5169), 5196 (S5196) และ 5197 (S5197)

SOV	df	SS	MS	F	P
Treatment	2	40.810	20.407	3.980	0.143
Error	3	15.380	5.127		
Total	5	56.190			

ตารางที่ จ-39 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด วันที่ 8 ของ ตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5169 (S5169), 5196 (S5196) และ 5197 (S5197)

SOV	df	SS	MS	F	P
Treatment	2	57.773	28.887	10.570	0.044
Error	3	8.200	2.733		
Total	5	65.973			

ตารางที่ จ-40 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด วันที่ 10 ของ ตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5169 (S5169), 5196 (S5196) และ 5197 (S5197)

SOV	df	SS	MS	F	P
Treatment	2	29.620	14.811	4.100	0.139
Error	3	10.840	3.613		
Total	5	40.460			

ตารางที่ จ-41 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด วันที่ 12 ของ ตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5169 (S5169), 5196 (S5196) และ 5197 (S5197)

SOV	df	SS	MS	F	P
Treatment	2	27.053	13.527	4.320	0.131
Error	3	9.400	3.133		
Total	5	36.453			

ตารางที่ จ-42 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด วันที่ 14 ของ ตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5169 (S5169), 5196 (S5196) และ 5197 (S5197)

SOV	df	SS	MS	F	P
Treatment	2	18.890	9.447	1.920	0.290
Error	3	14.760	4.920		
Total	5	33.650			

ตารางที่ จ-13 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณแอลกอฮอล์ของตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5169 (S5169)

SOV	df	SS	MS	F	P
Treatment	7	248.583	35.512	85.230	0.000
Error	8	3.333	0.417		
Total	15	251.916			

ตารางที่ จ-14 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณแอลกอฮอล์ของตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5196 (S5196)

SOV	df	SS	MS	F	P
Treatment	7	194.960	27.851	23.060	0.000
Error	8	9.663	1.208		
Total	15	204.624			

ตารางที่ จ-15 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณแอลกอฮอล์ของตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5197 (S5197)

SOV	df	SS	MS	F	P
Treatment	7	219.940	31.419	19.950	0.000
Error	8	12.600	1.575		
Total	15	232.540			

ตารางที่ จ-16 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดของตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5169 (S5169), TISTR 5196 (S5196) และ TISTR 5197 (S5197)

SOV	df	SS	MS	F	P
Treatment	2	2.486	1.243	0.060	0.946
Error	15	337.158	22.477		
Total	17	339.644			

ตารางที่ จ-17 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณรงควัตถุสีเหลืองของตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5169 (S5169), TISTR 5196 (S5196) และ TISTR 5197 (S5197)

SOV	df	SS	MS	F	P
Treatment	2	0.009	0.006	0.530	0.600
Error	15	0.130	0.009		
Total	17	0.140			

ตารางที่ จ-18 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณรงควัตถุสีส้มของตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5169 (S5169), TISTR 5196 (S5196) และ TISTR 5197 (S5197)

SOV	df	SS	MS	F	P
Treatment	2	0.001	0.000	0.120	0.889
Error	15	0.034	0.002		
Total	17	0.035			

ตารางที่ จ-19 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณรงควัตถุสีแดงของตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5169 (S5169), TISTR 5196 (S5196) และ TISTR 5197 (S5197)

SOV	df	SS	MS	F	P
Treatment	2	0.001	0.000	0.200	0.822
Error	15	0.020	0.001		
Total	17	0.021			

ตารางที่ จ-20 การวิเคราะห์ความแปรปรวนฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5169 (S5169), TISTR 5196 (S5196) และ TISTR 5197 (S5197)

SOV	df	SS	MS	F	P
Treatment	2	1.952	0.976	0.230	0.794
Error	15	62.637	4.176		
Total	17	64.589			

ตารางที่ จ-21 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณสารซิทรีนินของตัวอย่างไวน์โคจิข้าวแดงที่หมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5169 (S5169), TISTR 5196 (S5196) และ TISTR 5197 (S5197)

SOV	df	SS	MS	F	P
Treatment	2	0.000	0.000	0.350	0.709
Error	15	0.000	0.000		
Total	17	0.000			

ตารางที่ จ-22 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณกรดทั้งหมดของตัวอย่างน้ำส้มสายชูโคจิข้าวแดงที่หมักด้วย *Acetobacter pasteurianus* TISTR 102

SOV	df	SS	MS	F	P
Treatment	13	22.875	1.760	27.930	0.000
Error	14	0.882	0.063		
Total	27	23.757			

ตารางที่ จ-23 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณแอลกอฮอล์ของตัวอย่างน้ำส้มสายชูโคจิข้าวแดงที่หมักด้วย *Acetobacter pasteurianus* TISTR 102

SOV	df	SS	MS	F	P
Treatment	13	18.049	1.388	6.620	0.001
Error	14	2.936	0.210		
Total	27	20.985			

ตารางที่ จ-23 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่า pH ของตัวอย่างน้ำส้มสายชูโคจิข้าวแดงที่หมักด้วย *Acetobacter pasteurianus* TISTR 102

SOV	df	SS	MS	F	P
Treatment	13	0.293	0.023	37.060	0.000
Error	14	0.009	0.001		
Total	27	0.301			

ตารางที่ จ-24 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดของตัวอย่างน้ำส้มสายชูโคจิข้าวแดงที่หมักด้วย *Acetobacter pasteurianus* TISTR 102

SOV	df	SS	MS	F	P
Treatment	13	0.022	0.002	0.020	1.000
Error	14	1.250	0.090		
Total	27	1.272			

ตารางที่ จ-25 การวิเคราะห์ความแปรปรวนจำนวนยีสต์ และราของตัวอย่างน้ำส้มสายชูโคจิข้าวแดงที่หมักด้วย *Acetobacter pasteurianus* TISTR 102

SOV	df	SS	MS	F	P
Treatment	13	2.145	0.165	5.630	0.000
Error	28	0.820	0.029		
Total	41	2.965			

ตารางที่ จ-25 การวิเคราะห์ความแปรปรวนจำนวนแบคทีเรียกรดอะซิดิกของตัวอย่างน้ำส้มสายชูโคจิข้าวแดงที่หมักด้วย *Acetobacter pasteurianus* TISTR 102

SOV	df	SS	MS	F	P
Treatment	13	3.981	0.306	12.030	0.000
Error	14	0.357	0.025		
Total	27	4.338			