



รายงานผลการวิจัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้

เรื่อง

การพัฒนาเทคนิคการหมักในการผลิตเครื่องปรุงรสมิรินจากข้าวเหนียวไทย
DEVELOPMENT OF FERMENTATION TECHNIQUE FOR MIRIN
SEASONING PRODUCTION FROM THAI STICKY RICE

โดย

สิทธิสิน บวรสมบัติ สกุนณี บวรสมบัติ

2553



รายงานผลการวิจัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้

เรื่อง การพัฒนาเทคนิคการหมักในการผลิตเครื่องปรุงรสมีรินจากข้าวเหนียวไทย
DEVELOPMENT OF FERMENTATION TECHNIQUE FOR MIRIN
SEASONING PRODUCTION FROM THAI STICKY RICE

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2550

จำนวน 250,000 บาท

หัวหน้าโครงการ สิริธิสิน บวรสมบัติ

ผู้ร่วมโครงการ สกฤณี บวรสมบัติ

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์

มีนาคม 2552

คำนิยม

ผู้วิจัยใคร่ขอขอบพระคุณภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ และภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่และอุปกรณ์ในการทำวิจัย ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่าน และนักศึกษาที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ ตลอดจนถึงสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ให้ความสนับสนุนงบประมาณประจำปี พ.ศ. 2550 สำหรับการวิจัยในครั้งนี้

คณะผู้วิจัย



สารบัญเรื่อง

	หน้า
สารบัญตาราง	(ก)
สารบัญภาพ	(ข)
บทคัดย่อภาษาไทย	(ค)
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	(ง)
คำนำ	(จ)
วัตถุประสงค์	(ฉ)
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	(ช)
การตรวจเอกสาร	1
อุปกรณ์และวิธีการ	11
ผลการทดลอง	14
วิจารณ์ผล	24
สรุปผล	27
เอกสารอ้างอิง	28

(ก)

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	องค์ประกอบทางเคมีของมิริน	1
2	การจำแนกชนิดข้าวตามปริมาณอะมิโลส	3
3	สายพันธุ์ราที่พบในลูกแป้งและไวน์ข้าว	6
4	การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักข้าวเหนียว ที่ผ่านการล้างน้ำและไม่ผ่านการล้างน้ำก่อนนำไปหมักด้วยรา	14
5	การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักข้าวเหนียว ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน	19
6	ค่าสีและปริมาณอัลกอฮอล์ของไวน์หวานที่ผ่านการแยกตะกอน ด้วยวิธีการแช่เย็นและวิธีการกรอง	22

สารบัญภาพ

รูปภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างแบ่งในเมล็ดข้าว : อะมิโลส (A) และอะมิโลเพคติน (B)	2
2	แผนภูมิกระบวนการหมักสาเกหวานเพื่อผลิตมิรินและการหมักไวน์ข้าวของไทย	5
3	การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักข้าวเหนียวที่ผ่านการล้างน้ำและไม่ผ่านการล้างน้ำก่อนนำไปหมักด้วยรา: ข้าวเหนียวที่ผ่านการล้างน้ำก่อนคลุกสปอร์รา (ก) และข้าวเหนียวที่ไม่ผ่านการล้างน้ำ (ข)	16
4	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการหมักข้าวเหนียวด้วยวิธีการล้างน้ำข้าวเหนียวก่อนคลุกสปอร์ราและวิธีการไม่ล้างน้ำข้าวเหนียว	17
5	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการหมักข้าวเหนียวเมื่อเติมสปอร์ในปริมาณที่แตกต่างกัน	18
6	น้ำเชื่อมที่ผลิตจากการหมักข้าวเหนียว ณ อุณหภูมิการหมักที่แตกต่างกัน 3 ระดับ: 25 ⁰ C (ก), 30 ⁰ C (ข) และ 37 ⁰ C	20
7	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นเมื่อหมักที่อุณหภูมิแตกต่างกัน	21
8	การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของน้ำหมักในระหว่างการหมักไวน์	21
9	ไวน์หวานที่หมักจากน้ำเชื่อมข้าว	22

(ค)

การพัฒนาเทคนิคการหมักในการผลิตเครื่องปรุงรสมิรินจากข้าวเหนียวไทย
DEVELOPMENT OF FERMENTATION TECHNIQUE FOR MIRIN
SEASONING PRODUCTION FROM THAI STICKY RICE

สิทธิสิน บวรสมบัติ¹ และ สกุนณี บวรสมบัติ²

¹ คณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้

² ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

บทคัดย่อ

การพัฒนาเทคนิคการหมักไวน์หวานจากข้าวเหนียวเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตมิริน ซึ่งเป็นเครื่องปรุงรสชนิดหนึ่งในประเทศญี่ปุ่น สามารถดำเนินการได้โดยการหมักข้าวเหนียวด้วยสปอร์ของรา *Rhizopus* sp. N44-E เพื่อให้ได้น้ำเชื่อมที่มีน้ำตาลรีดิวส์เป็นส่วนประกอบ แล้วทำการหมักต่อในขั้นที่สองเพื่อให้ได้ไวน์หวาน จากการทดลองพบว่า การนำข้าวเหนียวมาล้างน้ำก่อนหมักด้วยสปอร์รา *Rhizopus* sp. N44-E นาน 7 วัน จะทำให้ได้น้ำเชื่อมที่มีน้ำตาลรีดิวส์เป็นองค์ประกอบสูงถึงร้อยละ 24.43 (น้ำหนัก/ปริมาตร) และปริมาณกล้าเชื้อในรูป spore suspension ประมาณ $1.0 \times 10^6 - 1.0 \times 10^8$ สปอร์/มล จะทำให้ได้น้ำตาลรีดิวส์ในช่วงร้อยละ 22.52- 26.07 อิทธิพลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการหมักในช่วง $25^\circ\text{C} - 37^\circ\text{C}$ จะส่งผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่ถูกผลิตขึ้นในช่วงประมาณร้อยละ 19.11 - 24.46 การทดลองเติมยีสต์บริสุทธิ์ในน้ำเชื่อมที่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ประมาณร้อยละ 25 จะได้ไวน์หวานที่มีแอลกอฮอล์ประมาณร้อยละ 7.77 (ปริมาตร/ปริมาตร) ซึ่งสามารถแยกตะกอนออกได้ด้วยวิธีการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C และด้วยวิธีการกรอง

ABSTRACT

The development of fermentation technique for the production of sweet wine in order to use as raw material for Mirin, well known Japanese seasoning, can be achieved by introducing spore of *Rhizopus* sp. N44-E onto steamed sticky rice. The sticky rice syrup, end product, will go to the second fermentation step for obtaining sweet wine. Then, the washing of steamed sticky rice showed the advantage of syrup production with high reducing sugar content of 24.43% (w/v) in 7 days. And the use of spore suspension as starter in the range of 1.0×10^6 – 1.0×10^8 spores/ml yielded the amount of reducing sugar of 22.52- 26.07%. The effect of temperature on fermentation process revealed the temperature between 25°C - 37°C gave the reducing sugar content of 19.11 - 24.46%. The study of using pure yeast culture, *Saccharomyces cerevisiae*, for alcoholic fermentation from syrup containing of reducing sugar of about 25% showed the sweet wine of 7.77% (v/v) alcohol. The clarification techniques between the low temperature ageing at 4°C for 2 weeks and the filtration by filter paper did the good level of result.

คำนำ

ประเทศไทยมักประสบกับปัญหาเกี่ยวกับราคาผลผลิตภายในประเทศตกต่ำ และการถูกกดราคาในตลาดต่างประเทศ อาทิ ข้าว มันสำปะหลัง ข้าวโพด ลำไย และสับปะรด เป็นต้น หนทางหนึ่งที่จะช่วยบรรเทาปัญหาดังกล่าวได้ก็คือ นำผลิตผลการเกษตรดังกล่าวมาทำการแปรรูปให้กลายเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูงในการตลาด ทั้งตลาดภายในและตลาดต่างประเทศ และผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นควรเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูง (high value product) ในปัจจุบันมีผู้ประกอบการหลายรายทั้งในระดับชุมชนและวิสาหกิจขนาดกลางและขนาดเล็ก (SMEs) นำผลิตผลดังกล่าวมาทำเป็นไวน์ เช่นเดียวกับผลไม้และพืชสมุนไพรชนิดอื่น ซึ่งผลลัพธ์ที่เกิดขึ้นในระยะยาว คือ ตลาดไวน์ของผู้ผลิตคนไทยมิได้เติบโตเหมือนดังที่คาดหวังไว้ ผู้ประกอบการหลายราย ถึงกับต้องเลิกกิจการ ส่งผลให้การยกระดับราคาผลผลิตทางการเกษตรดังกล่าว ไม่สามารถไปถึงจุดหมายที่ยั่งยืนได้

ในประเทศญี่ปุ่น ประชาชนของประเทศรู้จักเครื่องปรุงรส (seasoning) ชนิดหนึ่งที่มีชื่อว่า มิริน (mirin) หรือ สาเกหวาน (sweet sake) ซึ่งเป็นผลผลิตจากการหมักข้าวญี่ปุ่นช่วงระยะเวลาหนึ่ง เพื่อให้จุลินทรีย์ได้เปลี่ยนแปลงในข้าวให้กลายเป็นน้ำตาล และอัลกอฮอล์ในที่สุด ต่อจากนั้นจึงแยกน้ำใสที่มีอัลกอฮอล์เป็นองค์ประกอบ นำมาทำการปรุงรสด้วยน้ำเชื่อมและเกลือ จนได้ผลิตภัณฑ์ที่มีรสหวานหอมใช้เป็นเครื่องปรุงรสในอาหารหลายชนิด อาทิ ซุอิฉะว น้ำสลัด และเนื้อหมักชนิดต่างๆ เป็นต้น

ประเทศไทยจัดเป็นประเทศหนึ่งที่มีผลิตผลทางการเกษตรมากมาย ที่มีราคาถูก มีปริมาณมากเกินกว่ากำลังการบริโภคภายในประเทศ แต่มีศักยภาพสูงในด้านคุณสมบัติที่เหมาะสมที่จะนำมาแปรรูปเป็นมิรินได้ วัตถุดิบที่มีแนวโน้มที่จะสามารถมาทำการทดลองผลิตมิรินที่มีคุณภาพได้แก่ ข้าวเหนียว ซึ่งเป็นผลิตผลทางเกษตรที่หาได้ง่ายและมีราคาถูก

ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้ จึงได้ให้ความสำคัญต่อการนำข้าวเหนียวไทยมาหมักให้เป็นไวน์หวาน เพื่อนำไปใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นในการผลิตมิริน โดยมุ่งเน้นที่การพัฒนาเทคนิคในการหมักไวน์หวานจากข้าวเหนียว เพื่อให้ได้ผลผลิตที่ดีและมีคุณภาพที่เหมาะสมต่อการนำไปผลิตเป็นมิริน

(๑)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาเทคนิคการหมักที่เหมาะสมต่อการใช้ข้าวเหนียวไทยเป็นวัตถุดิบในการผลิตไวน์หวาน
2. เพื่อศึกษาคุณภาพไวน์หวานที่ได้เพื่อใช้ปรุงผสมเป็นเครื่องปรุงรสมีริน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้เทคโนโลยีที่ง่ายสำหรับการผลิตไวน์หวานเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นในการผลิตมีริน
2. สามารถเพิ่มทางเลือกในการใช้ประโยชน์จากข้าวเหนียว



การตรวจเอกสาร

มิริน (Mirin) หรือ เหล้าสาเกหวาน เป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้ปรุงแต่งรสชาติในอาหารญี่ปุ่น โดยเฉพาะการหมักเนื้อสัตว์ซึ่งจะช่วยให้เนื้อนุ่มและทำให้เนื้อมีความนุ่มเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังเป็นส่วนผสมในการปรุงอาหารญี่ปุ่นหลายชนิด

จุดเด่นของมิริน คือ มีความหวานสูง (ประมาณ 40 – 50 เปอร์เซ็นต์) ร่วมกับกลิ่นรสของอัลกอฮอล์ โดยมีปริมาณอัลกอฮอล์อยู่ระหว่างร้อยละ 6 – 14

จากรายงานของ Oyashiki et al. (1988) การผลิตมิรินแบบดั้งเดิมเริ่มจากการหมักข้าวเหนียวหนึ่ง 628 กรัม ร่วมกับโคจิของเชื้อ *Asp.ergillus oryzae* 93 กรัม และอัลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 35 จำนวน 279 กรัม เป็นเวลา 30 วัน จะได้ของเหลวสีเหลืองใสเรียกมิริน ซึ่งมีองค์ประกอบดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีของมิริน

องค์ประกอบ	ปริมาณ
Total sugar as glucose (%)	40.9
Reducing sugar as glucose (%)	39.5
Reducing sugar / total sugar	0.965
Total nitrogen (%)	0.377
Amino - N / total – N	0.365
Ethanol (%)	10.1
Volatile matter (%)	56.2
Acidity ^a	0.45
Sp.ecific gravity at 15 °C	1.167
Mirin obtained (g)	6.430
(Mirin / mash)	(0.948)

^a (ml of 0.1 N NaOH / 10 ml Mirin)

ที่มา : Oyashiki et al. (1988)

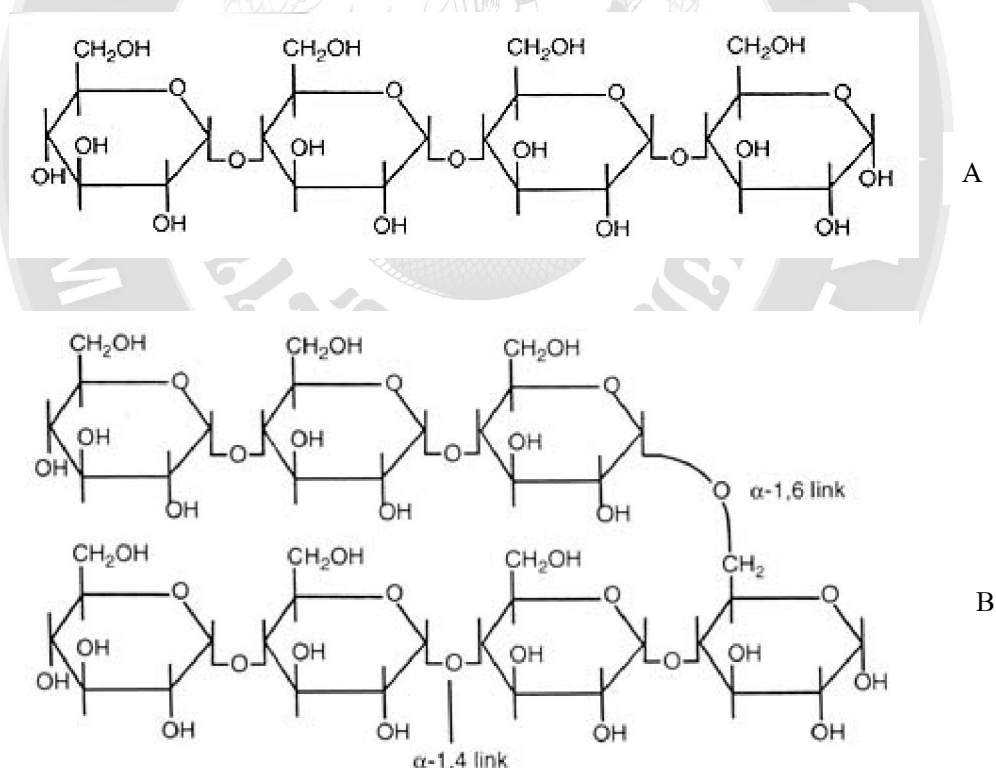
นอกจากนี้ในระหว่างขั้นตอนการหมักโคจิ พบว่ามีรินเป็นแหล่งของกรดอะมิโนถึง 17 ชนิด โดยเฉพาะกรดกลูตามิก อาร์จินีน และลิวซีน ซึ่งมีปริมาณมากถึง 59, 54 และ 38 มิลลิกรัม ในโคจิ 100 กรัม (Oyashiki et al., 1988)

ปัจจัยสำคัญในการผลิตมิริน

ปัจจัยหลักในการผลิตมิรินให้มีคุณภาพดี ได้แก่ ข้าว เชื้อจุลินทรีย์ และอัลกอฮอล์

1. ข้าว

เมล็ดข้าวจะประกอบด้วยแป้งร้อยละ 90 ส่วนที่เหลือได้แก่ โปรตีน ไขมัน เถ้า และ น้ำ องค์ประกอบของแป้งในเมล็ดข้าวมี 2 ชนิด คือ อะมิโลส (amylose) (รูปภาพที่ 1A) เป็น polymer ของ D-glucose ที่มีโครงสร้างต่อกันเป็นเส้นตรง และอะมิโลเพคติน (amylopectin) (รูปภาพที่ 1B) ซึ่งมีโครงสร้างแบบแตกแขนง สัดส่วนของปริมาณองค์ประกอบทั้ง 2 ชนิดในเมล็ดข้าวที่ไม่เท่ากัน ทำให้ข้าวแต่ละชนิดและสายพันธุ์มีลักษณะแตกต่างกัน ดังนั้นเมื่อจำแนกชนิดข้าวตามปริมาณอะมิโลสจะทำให้สามารถแบ่งชนิดข้าวได้เป็น 5 ชนิด ดังตารางที่ 2



รูปภาพที่ 1 โครงสร้างแป้งในเมล็ดข้าว : อะมิโลส (A) และอะมิโลเพคติน (B)

ที่มา : Green (2002)

ตารางที่ 2 การจำแนกชนิดข้าวตามปริมาณอะมิโลส

ปริมาณอะมิโลส (ร้อยละ)	ชนิดข้าว	ลักษณะข้าวสุก
1 – 2	ข้าวเหนียว	เหนียวมาก
2 – 9	ข้าวเจ้าอะมิโลสต่ำมาก	เหนียวนุ่ม
9 – 20	ข้าวเจ้าอะมิโลสต่ำ	เหนียวนุ่ม
20 – 25	ข้าวเจ้าอะมิโลสปานกลาง	นุ่ม ค่อนข้างเหนียว
25 – 33	ข้าวเจ้าอะมิโลสสูง	ร่วนแข็ง

ที่มา : อรอนงค์ (2538)

ข้าวไทย (*Oryza sativa* var. *Indica*) มีลักษณะเมล็ดดอมน ยาว แบ่งตามปริมาณอะมิโลสได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

1.1 ข้าวเจ้า ประกอบด้วยอะมิโลส 15-31 เปอร์เซ็นต์ มากน้อยขึ้นกับสายพันธุ์ ปริมาณอะมิโลสมีผลต่อคุณภาพของข้าวสุกคือพันธุ์ที่มีอะมิโลสมากเมื่อหุงสุกจะแข็ง ถ้ามีอะมิโลสน้อยจะอ่อนนุ่ม

1.2 ข้าวเหนียว มีอะมิโลสน้อยมากหรือไม่มีอะมิโลสเลย แต่มีอะมิโลเพคตินสูงถึงร้อยละ 95 ทำให้มีความอ่อนนุ่มสูง

สุนันทา (2538) ศึกษาถึงพันธุ์ข้าวที่เหมาะสมในการทำสาเกโดยแบ่งข้าวที่ใช้ศึกษาเป็นกลุ่มข้าวที่มีอะมิโลสต่ำ (< ร้อยละ 20) ข้าวอะมิโลสปานกลาง (ร้อยละ 20-25) และข้าวที่มีอะมิโลสสูง (>ร้อยละ 25) โดยทำการหมักเป็นเวลา 21 วัน พบว่าข้าวอะมิโลสต่ำ จะทำให้แอลกอฮอล์สูงสุด รองลงมาคือ อะมิโลสปานกลาง และสูงตามลำดับ สอดคล้องกับวรรัตน์ (2539) อ้างถึงรายงานของ ลูกจันทร์ (2535) กล่าวว่าข้าวที่เหมาะสมสำหรับการทำสาเกควรเป็นข้าวที่มีอะมิโลสต่ำ เช่น ข้าวเหนียว เพราะเมื่อนึ่งสุกจะมีลักษณะอ่อนนุ่มไม่แน่นทำให้เชื้อราเจริญได้ดี และการทำงานของเอนไซม์จะมีประสิทธิภาพสูงให้กลิ่นรสที่ดีกว่าการใช้ข้าวเจ้า

ข้าวญี่ปุ่น (*Oryza sativa* var. *Japonica*) ที่ใช้ในการผลิตมิรินจะต่างจากข้าวไทย คือ ลักษณะเมล็ดอ้วน สั้น เหนียว มีอะมิโลสร้อยละ 10 – 24 เมื่อหุงสุกจะเหนียวนุ่มมากกว่าข้าวไทย ในการหมักสาเกพันธุ์ข้าวมีความสำคัญมาก ข้าวแต่ละสายพันธุ์จะให้ผลผลิตที่แตกต่างกันและมีกลิ่นที่เป็นเอกลักษณ์ ข้าวสายพันธุ์ดีสำหรับใช้ทำสาเกจะต้องปลูกในพื้นที่ที่ดีและภูมิอากาศ

เหมาะสมรวมทั้งมีการเก็บเกี่ยวและเก็บรักษาที่ดี ข้าวที่จัดว่าเป็น King of sake rice ได้แก่ ข้าวพันธุ์ Yamada Nishiki ซึ่งให้กลิ่นรสที่นุ่มนวล

สำหรับการหมักเหล้าและการผลิตอัลกอฮอล์ในประเทศไทย โดยทั่วไปจะเลือกใช้ข้าวที่มีอะมิโลเพคตินสูง (ข้าวเหนียว) เนื่องจากข้าวมีความอ่อนนุ่มทำให้เส้นใยเชื้อราเจริญเข้าไปในเมล็ดข้าวได้ดีกว่าในข้าวเจ้าที่มีอะมิโลสสูงซึ่งข้าวแห้งเร็วไม่ม่น้ำและไม่จับเป็นก้อนทำให้เชื้อราไม่สามารถยึดจับและสร้างเส้นใยได้ดีเท่าที่ควร (โชคชัย และคณะ, 2547) ข้าวที่ใช้ในการหมักอัลกอฮอล์ควรมีโปรตีนต่ำซึ่งทำโดยการขัดสีผิวข้าวออกเหลือประมาณร้อยละ 70 เพื่อกำจัดโปรตีนไขมัน และเถ้า ซึ่งเป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดสีและกลิ่นรสที่ไม่ดี เนื่องจากกรดอะมิโนบางชนิดอาจเปลี่ยนไปเป็น fusel oil ได้

2. เชื้อจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตอัลกอฮอล์จากแป้งคือ เชื้อรา และยีสต์ ในขั้นตอนการเตรียมโคจจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญคือเชื้อราในกลุ่ม *Asp.ergillus* sp. เช่น *A. oryzae* และ *A. niger* ซึ่งจะผลิตเอนไซม์อะมิเลสเพื่อย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล ส่วนในขั้นตอนการหมักอัลกอฮอล์ จุลินทรีย์ที่มีบทบาท ได้แก่ ยีสต์โดยเฉพาะสายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* แต่ในการผลิตมิรินแบบดั้งเดิมอาศัยเพียงเอนไซม์จากเชื้อราในโคจิเพื่อทำการย่อยแป้งในข้าวให้เป็นน้ำตาล ส่วนอัลกอฮอล์ได้มาจากการเติมลงไปตั้งแต่เริ่มต้นร่วมกับโคจิและข้าว

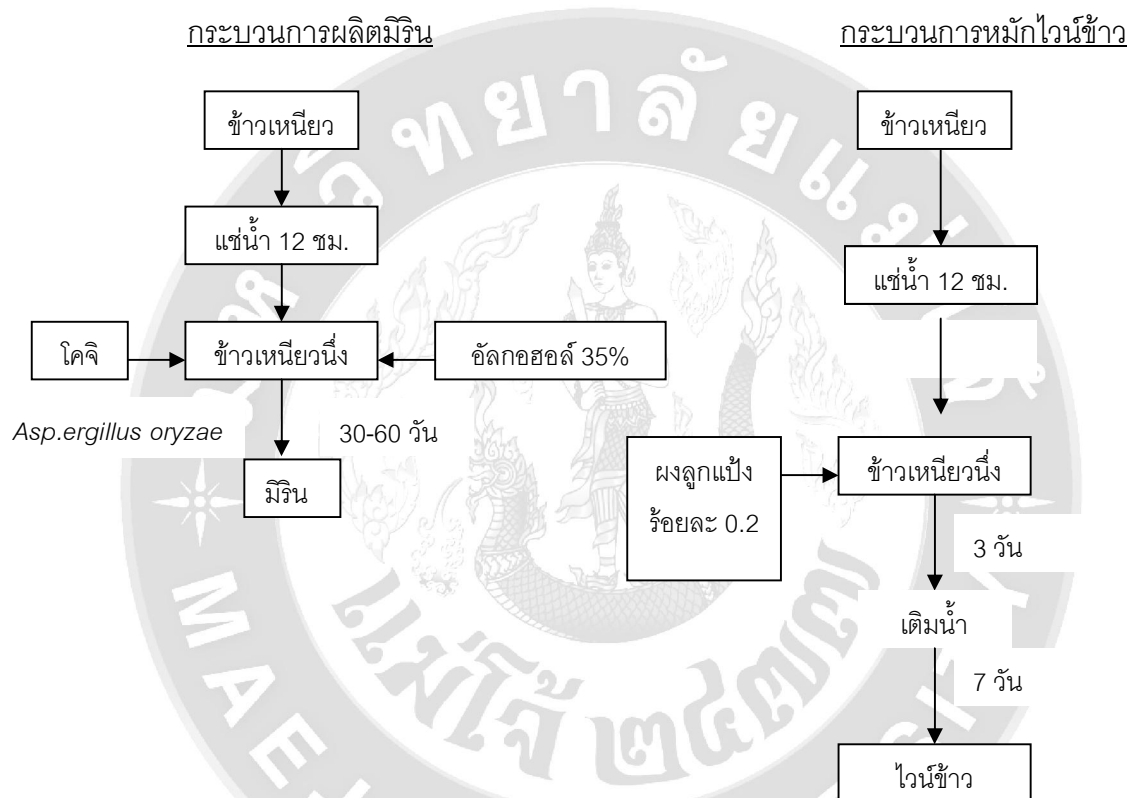
3. อัลกอฮอล์

ในการผลิตมิรินแบบดั้งเดิมจะมีการเติมอัลกอฮอล์ 35 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับโคจิและข้าวเหนียวในการหมัก ซึ่งพบว่าอัลกอฮอล์ที่ความเข้มข้นดังกล่าวสามารถป้องกันการปนเปื้อนจากแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสียระหว่างการหมักได้ แต่จะส่งผลยับยั้งหรือลดกิจกรรมของเอนไซม์ในโคจิด้วย (Oyashiki et al., 1988) จึงได้มีการศึกษาถึงความเข้มข้นของอัลกอฮอล์ที่เหมาะสมต่อการหมักพบว่าที่อัลกอฮอล์ความเข้มข้น 12.5 เปอร์เซ็นต์ ไม่ส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ในโคจิและสามารถป้องกันการปนเปื้อนจากแบคทีเรียได้

การผลิตมิรินโดยวิธีดั้งเดิมใช้ระยะเวลาในการหมักค่อนข้างนานและต้องมีการเติมอัลกอฮอล์ลงไปเป็นจำนวนมากซึ่งทำให้ต้นทุนการผลิตสูง ในขณะที่เปอร์เซ็นต์อัลกอฮอล์ของมิรินที่มีจำหน่ายทั่วไปไม่สูงมากนัก (ร้อยละ 6-14) สามารถผลิตได้จากกระบวนการหมักโดยยีสต์ ประเทศไทยมีข้าวเหนียวหลากหลายสายพันธุ์และมีผลผลิตข้าวปริมาณมากรวมทั้งมีภูมิปัญญาในการหมักอัลกอฮอล์มาแต่โบราณ ดังนั้นการผลิตมิรินจากข้าวเหนียวไทยโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกแล้วจากกล้าเชื้อ (ลูกแป้ง) และกรรมวิธีการหมักที่เหมาะสมน่าจะสามารถผลิตมิริน

คุณภาพดีได้ โดยเปรียบเทียบวิธีการผลิตมิรินและการผลิตไวน์ข้าวของไทยจะเห็นได้ว่าการหมักไวน์ข้าวของไทยใช้ระยะเวลาสั้นกว่าและมีกระบวนการผลิตที่ไม่ซับซ้อน (รูปภาพที่ 2)

ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อคุณภาพไวน์ข้าวของไทยคือกล้าเชื้อหรือลูกแป้ง ซึ่งเป็นแหล่งของเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด โดยชนิดและปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์จะแตกต่างกันออกไปตามชนิดของลูกแป้งและแหล่งผลิต (นภา, 2535) โดยบทบาทของจุลินทรีย์ในลูกแป้งในการหมักไวน์ข้าวแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงในเมล็ดข้าวให้เป็นน้ำตาล และขั้นตอนการหมักน้ำตาลให้เป็นอัลกอฮอล์ (ยุพกนิษฐ์, 2546) ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้



รูปภาพที่ 2 แผนภูมิกระบวนการหมักสาเกหวานเพื่อผลิตมิรินและการหมักไวน์ข้าวของไทย

1. ขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงไปเป็นน้ำตาล (Saccharification)

จุลินทรีย์จะสร้างเอนไซม์ในกลุ่มอะมิเลส ได้แก่ แอลฟาอะมิเลส (α -amylase) เบต้าอะมิเลส (β -amylase) และกลูโคอะมิเลส (glucoamylase) ย่อยโครงสร้างแอลฟาพอร์มโนโมเลกุลของแป้งให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเล็ก โดยรากกลุ่มที่มีบทบาทในการสร้างเอนไซม์ปริมาณมาก ได้แก่ Class Zygomycetes, Order Mucorales, Family Mucoraceae จีโนสสำคัญคือ *Rhizopus* sp.

Mucor sp. และ *Amylomyces* sp. และ Class *Deuteromycetes*, Order *Mobiliales*, Family *Moniaceae* โดยจีนัสสำคัญคือ *Asp.ergillus* sp. ซึ่งอยู่ใน Class *Zygomycetes* จะสร้างเอนไซม์สูงพร้อมกับกรดอินทรีย์ เช่น กรดฟูมาลิก กรดซิตริก และกรดแลคติก ทำให้เกิดรสเปรี้ยวในสาโทกรดที่เกิดขึ้นจะช่วยยับยั้งจุลินทรีย์อื่นที่จะมาปนเปื้อนได้

เชื้อราจะสร้างเส้นใยจำนวนมากแผ่กระจายปกคลุมบนผิวเมล็ดข้าว แทรกตัวเข้าไปในช่องว่างระหว่างเมล็ดข้าว และแทงทะลุเข้าไปในเมล็ดข้าว ซึ่งจะสร้างเอนไซม์จำนวนมากออกมาย่อยแบ่งเป็นน้ำตาล สร้างกรดอินทรีย์ สารอาหาร และวิตามินที่เป็นประโยชน์ต่อการเจริญของยีสต์ ในช่วงที่มีออกซิเจนต่ำจะไม่เกิดการหมักแต่จะแตกหน่อเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างรวดเร็ว แต่เมื่อมีการเติมน้ำลงไปทำให้เป็นสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนราจะหยุดกิจกรรม ส่วนยีสต์จะเปลี่ยนรูปแบบจากการสร้างพลังงานจากการหายใจโดยใช้ออกซิเจนมาเป็นการหมักต่อไป

เมื่อศึกษาจุลินทรีย์ในลูกแป้งและไวน์ข้าว ของไทยพบว่า โดยส่วนใหญ่เป็นรา โดยเฉพาะ *Rhizopus* sp. N44-Ep. และ *Mucor* มนตรี (2521) (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 สายพันธุ์ราที่พบในลูกแป้งและไวน์ข้าว

สกุล	สายพันธุ์
<i>Rhizopus</i>	<i>R. niveus</i> , <i>R. delemar</i> , <i>R. formosaensis</i> var. <i>multiplicisp.orus</i> , <i>R. japonicus</i> , <i>R.chinensis</i> , <i>R. pseudochinensis</i> , <i>R. chlamydomucor</i> , <i>R. rhizopodifermis</i> , <i>R. microsp.orus</i> , <i>R.arrhizus</i> , <i>R. cambodja</i> , <i>R. oryzae</i>
<i>Chlamydomucor</i>	<i>Ch. rouxii</i> , <i>Ch. oryzae</i> , <i>Ch. rouxianus</i> , <i>Ch. japonicus</i> , <i>Ch. Chlamydosp.orus</i>
<i>Mucor</i>	<i>M. rouxii</i> , <i>M. fragillis</i> , <i>M. javanicus</i>
<i>Asp.ergillus</i>	<i>Asp.ergillus oryzae</i> , <i>A. niger</i>
<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium</i> sp.
<i>Monilia</i>	<i>Monilia</i> sp.

ที่มา: มนตรี (2521) และ ยุพกนิษฐ์ (2546)

2. ขั้นตอนการหมักน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ (Alcoholic fermentation)

โดยยีสต์ในกลุ่ม *Ascomycetous yeast*, Class *Ascomycetes*, Subclass *Hemiascomycetidae*, Order *Endomycetales*, Family *Saccharomyceidae* โดยมียีสต์สำคัญ ได้แก่ *Saccharomyces* sp., *Endomycopsis* sp., *Hansenula* sp. และยีสต์ใน Class *Blastomycetes*, Family *Cryptococcaceae*, โดยมียีสต์สำคัญ คือ *Torulopsis* sp. ซึ่งมีคุณสมบัติในการหมักสาโทที่ดีเพราะเจริญเติบโตเร็ว ทนทานต่อกรด ความเข้มข้นของน้ำตาล และทนต่อปริมาณแอลกอฮอล์ นอกจากนี้ยังพบกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดอื่น เช่น เอนไซม์โปรติเอสที่ย่อยสลายโปรตีนเป็นเปปไทด์และกรดอะมิโน เอนไซม์ไลเปสที่เปลี่ยนไขมันเป็นกรดไขมันและ กลีเซอรอล เกิดเป็นกลิ่นรสที่มีความซับซ้อนและกลิ่นหอมเฉพาะตัว เช่น กรดอะมิโนบางตัว คือ ลิซีนจะถูกยีสต์เปลี่ยนเป็นไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ซึ่งจะถูกเปลี่ยนต่อไปเป็นไอโซเอมิลอะซิเตททำให้สาโทมีกลิ่นที่ดียิ่งขึ้น ส่วนกรดลิซีนยังเป็นสารตั้งต้นของเอสเทอร์คือเอทิลลิซีนเนตที่เป็นสารให้กลิ่นหอมเฉพาะในสาเก เป็นต้น

การปรับปรุงกระบวนการผลิตมิรินและไวน์ข้าว

เพื่อให้ได้มิรินที่มีคุณภาพดีและผลผลิตเพิ่มขึ้น มีการพัฒนาการผลิตมิรินในด้านต่างๆ ดังนี้

1. การศึกษาและพัฒนาสายพันธุ์ข้าว

Zhang et al. (1997) ได้ทำการศึกษาลักษณะของเมล็ดแบ่งใน endosp.erm ของข้าวเหนียวกลุ่ม Indica โดยใช้ scanning electron microscope พบว่าในข้าวสายพันธุ์ที่ใช้ผลิตไวน์คุณภาพดีจะมีลักษณะเมล็ดแบ่งที่เรียงตัวสม่ำเสมอเป็นระเบียบโดยมีโครงสร้างแบบ polyhedral หรือ crystalline ในขณะที่สายพันธุ์ที่ไม่เหมาะสมต่อการหมักจะมีลักษณะเมล็ดแบ่งเป็นรูปร่างหรือวงกลมที่มีการเรียงตัวไม่เป็นระเบียบและมีขนาดที่ไม่สม่ำเสมอ

2. การใช้เอนไซม์ในกระบวนการผลิต

Oyashiki et al. (1987) ได้ศึกษาการทำโคจิแห้งที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 360 มิลลิเมตรปรอท เป็นเวลา 5 – 6 ชั่วโมง จะลดค่า Aw จากเดิม 0.88 เป็น 0.77 และลดปริมาณน้ำจากเดิม 0.39 เป็น 0.11 โดยโคจิแห้งยังคงมีกิจกรรมของเอนไซม์อยู่ เมื่อนำโคจิแห้งที่มีอายุการเก็บนาน 4 เดือน มาทำการหมักมิรินพบว่ายังให้ผลผลิตคุณภาพและรสชาติดีใกล้เคียงกับมิรินที่เตรียมจากโคจิสด ซึ่งวิธีดังกล่าวทำให้ลดต้นทุนและเวลาในการเตรียมโคจิเพื่อใช้ในการผลิตมิรินในแต่ละครั้งได้

นอกจากนี้ในการพัฒนาไวน์ข้าวในประเทศอินโดนีเซีย Suprianto et.al (1989) ศึกษาการทำ tape (ข้าวหมักของอินโดนีเซีย) โดยใช้กล้าเชื้อ คือ ragi เติมลงในข้าวเหนียวหนึ่งแล้ว

บ่มที่ 30 °C นาน 3 วัน พบว่าจะเกิดการย่อยแป้งในเมล็ดข้าวและเปลี่ยนไปเป็นน้ำตาล โดยการสร้างเอนไซม์อะไมเลสส่วนใหญ่จากเชื้อ *Rhizopus* sp. ส่วนกลิ่นที่ได้จะเกิดจากคุณสมบัติของเชื้อผสม *Streptococcus* sp., *Rhizopus* sp. และ *Saccharomycopsis* sp.

Ueda et.al (1992) กล่าวถึงการผลิตไวน์ข้าวโดยใช้เมล็ดข้าว (*Oryza sativa* var . Japonica , Reiho) แช่น้ำข้ามคืนแล้วบ่มเพาะไว้ที่อุณหภูมิ 25 °C นาน 7-8 วัน เพื่อให้เกิดการงอก ก่อนนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการหมัก ซึ่งข้าวที่กำลังงอกจะมีการสร้างเอนไซม์ต่าง ๆ เช่น protease , amylase เพื่อทำการย่อยองค์ประกอบของข้าว ดังนั้นเมื่อทำการหมักแล้วจะผลิตแอลกอฮอล์ได้เร็ว และให้กลิ่นที่ดีคล้ายเหล้าสาเกของญี่ปุ่น

2. การพัฒนาสายพันธุ์เชื้อ

Smith และคณะ (1977) ทำการหมักสาเก โดยหลังจากที่เชื้อรา *A. oryzae* ทำหน้าที่ในการไฮโดรไลซ์แป้งให้เป็นน้ำตาลแล้ว จึงทำการเติมเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* บ่มเป็นเวลา 20 วัน จะทำให้ได้สาเกที่มีแอลกอฮอล์ร้อยละ 20 - 22

Oyashiki et al. (1988) ใช้ *Aspergillus usamii* mut. Shiro-usamii IFO 6082 ซึ่งมีเอนไซม์ transglucosidase สูงมาใช้เตรียมโคจิเพื่อลดปริมาณกลูโคสในมิรินที่มากเกินไปซึ่งเป็นสาเหตุให้มิรินข้นเมื่อเก็บที่อุณหภูมิต่ำ การใช้เอนไซม์ดังกล่าวจะไปลดปริมาณกลูโคสซึ่งทำให้ความหวานของมิรินลดลงจึงเปลี่ยนมาใช้เอนไซม์ glucose isomerase จากเชื้อ *Streptomyces* sp. ตรึงบนกลูตาไรลไฮโดรเจลเป็น Immobilized glucose isomerase (IGI) หรือ ชื่อทางการค้าว่า Sweetase เพื่อเปลี่ยนกลูโคสในมิรินให้เป็นฟรุคโตส ทำให้ลดปัญหาการข้นเมื่อเก็บในที่เย็น (Chill haze) แต่ในขณะเดียวกันก็ไม่ลดความหวานของผลิตภัณฑ์

3. การพัฒนากระบวนการผลิต

Zhang (1982) ทำการปรับปรุงวิธีการผลิตไวน์ข้าวโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ คือ *Aspergillus oryzae* สายพันธุ์ D24-2135 , Su-15 , Su-16 , 2134 , 3800 , shao-6 และ ยีสต์ *Saccharomyces shao-shing* 1008 , *Sac. Fragrans* A-15 , Su-652 โดยเตรียมเชื้อราในรูป koji และยีสต์ในสภาพที่มีการถ่ายเทอากาศ เริ่มต้นเติม koji ร้อยละ 10-15 ลงในข้าวเหนียวหนึ่งและเติมน้ำในอัตราส่วน ข้าว : น้ำ เท่ากับ 1 : 1.6 – 2 เติมกรด lactic เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้ออื่น และปรับ pH ให้ได้ประมาณ 3.5-3.6 ตลอดระยะเวลาของการเปลี่ยนแป้งไปเป็นน้ำตาล จากนั้นเติมเชื้อยีสต์ 1 ใน 30 ส่วนของข้าวและทำการหมักที่ 36-38 °C นาน 2-3 วัน ซึ่งวิธีการนี้จะให้ผลิตภัณฑ์ที่คุณภาพดี ประหยัดเวลา และค่าใช้จ่าย

Ishikawa (1992) ทำการผลิตมิรินจากวัตถุดิบคือข้าวเจ้าหรือข้าวเหนียวโดยนำไปบดแล้วเติมเอนไซม์เพื่อให้เกิดการย่อยโมเลกุลของแป้งให้สั้นลงโดยใช้อุณหภูมิสูงประมาณ 90-100 °C

จากนั้นนำไปนึ่งผ่านความดัน แล้วจึงเติม koji หรือเอนไซม์ลงไปผสมใช้อุณหภูมิ 55-60 °C บ่มให้เกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงเป็นน้ำตาลร่วมกับการเติมอัลกอฮอล์ลงไปผสม เมื่อสิ้นสุดกระบวนการนำไปกรองและฆ่าเชื้อด้วยความร้อน

Takayama et al. (1996) แก้ไขปัญหามิรินขุ่นเนื่องจากโปรตีนที่เหลืออยู่โดยเติม persimmon tannin ลงไปหลังจากการฆ่าเชื้อผลิตภัณฑ์เพื่อตกตะกอนโปรตีน พบว่ามิรินที่มีปริมาณโปรตีนประมาณ 15 มิลลิกรัมต่อมิริน 100 กรัม ภายหลังการเติมสารตกตะกอนแล้วไม่มีปัญหามิรินขุ่นอีกต่อไป

Hondo et al. (2001) ทำศึกษาการผลิตมิรินจากมันฝรั่ง (potato) โดยนำมันฝรั่งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปอกเปลือก และบด ปริมาตร 200 กรัม ผสมกับโคจิข้าว 40 กรัม โขยู่ใน 100 กรัม เติมอัลกอฮอล์ร้อยละ 35 (ปริมาตรต่อปริมาตร) อัลกอฮอล์ และเติมร้อยละ 0.15 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) แอลฟาอะไมเลส คลุกให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 60 วัน ได้มิรินที่มีสีเหลืองใส รสชาติหวาน

การปรับปรุงกระบวนการผลิตไวน์ข้าวในไทย

การหมักไวน์ข้าวหรือสาโทเป็นภูมิปัญญาพื้นบ้านไทยที่สืบทอดต่อกันมา มีกรรมวิธีการหมักไม่ซับซ้อนแต่การจะผลิตให้ได้คุณภาพดีสม่ำเสมอและเก็บได้นานทำได้ยาก เนื่องจากปัจจัยต่างๆ เช่น ชนิดของข้าว พันธุ์ข้าว อัตราการขัดสี คุณภาพของลูกแป้ง คุณภาพของน้ำ อุปกรณ์ และเทคนิคการผลิต เป็นต้น ซึ่งได้มีการศึกษาถึงปัจจัยต่างๆ ในการหมักไวน์ข้าวให้มีคุณภาพดี โดยเฉพาะปัจจัยในเรื่องกล้าเชื้อ (ลูกแป้ง) ซึ่งการใช้ลูกแป้งในกระบวนการผลิตมักจะไม่สามารถควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ให้คงที่ได้ เนื่องจากความแตกต่างกันของแหล่งลูกแป้ง การเก็บรักษา การปนเปื้อน ซึ่งมีผลต่อชนิดและปริมาณจุลินทรีย์ในลูกแป้งที่ทำให้เกิดการหมัก

งานวิจัยส่วนใหญ่มุ่งเน้นที่จะทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์จากลูกแป้งแหล่งต่างๆ มาทำการศึกษาโดยต้องการนำจุลินทรีย์บริสุทธิ์ที่คัดเลือกคุณสมบัติแล้วมาใช้แทนการใช้ลูกแป้ง โดยมนตรี (2521) ได้ทำการคัดเลือกยีสต์และราจากลูกแป้งข้าวหมากและลูกแป้งเหล้ามาทำการทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยแป้งและประสิทธิภาพในการหมักอัลกอฮอล์โดยได้ใช้เชื้อรา *Amylomyces rouxii* MM – 136 ร่วมกับยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* MS – 50 ซึ่งสามารถหมักอัลกอฮอล์ได้เปอร์เซ็นต์สูงและเร็วรวมทั้งให้ปริมาณกรดต่ำกว่าการหมักโดยใช้ลูกแป้ง และเมื่อทำการทดสอบชิมพบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

วรรัตน์ (2539) ได้ศึกษาการหมักไวน์ข้าวเหนียวดำด้วยเชื้อบริสุทธิ์ *Rhizopus* sp. กับ *Saccharomycopsis* sp. เปรียบเทียบกับการหมักด้วยลูกแป้งเหล้า จาก อ.สอง จ.แพร่ ผลการ

ทดลองพบว่าการหมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์ที่มีปริมาณอัลกอฮอล์ร้อยละ 16.90 , Total soluble solid 7.10 °Brix, pH 3.79 และ total acidity 0.58% ส่วนไวน์ข้าวเหนียวดำที่หมักด้วยลูกแบ่งเหล่านี้มีปริมาณอัลกอฮอล์ต่ำกว่าคือ 12.75%, total soluble solid 10.10 °Brix, pH 3.55 และ total acidity ร้อยละ 0.92 และเมื่อทดสอบด้านสีกลิ่นรสและความยอมรับ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

สำหรับข้าวเหนียว จัดเป็นธัญพืชชนิดหนึ่งที่มีปริมาณอะมิโลเพคตินสูง เมื่อนำมานึ่งให้สุก จะมีความอ่อนนุ่ม เหมาะกับการเจริญของเส้นใยราในขณะทำการหมักเป็นโคจิ (koji) เพราะราจะสามารถแทงเส้นใยเข้าไปในเมล็ดข้าวได้ดี ข้าวที่ใช้ในการหมักอัลกอฮอล์ควรมีโปรตีนต่ำซึ่งทำโดยการขัดสีผิวข้าวออกเหลือประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ เพื่อกำจัดโปรตีน ไขมัน และเถ้า ซึ่งเป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดสีและกลิ่นรสที่ไม่ดี เนื่องจากกรดอะมิโนบางชนิดอาจเปลี่ยนไปเป็น fusel oil ได้ (โชคชัย และคณะ, 2547)

สุนันทา (2538) ศึกษาถึงพันธุ์ข้าวที่เหมาะสมในการทำสาเกโดยแบ่งข้าวที่ใช้ศึกษาเป็นกลุ่มข้าวที่มีอมิโลสต่ำ (<20%) ข้าวอมิโลสปานกลาง (20-25%) และข้าวที่มีอมิโลสสูง (>25%) โดยทำการหมักเป็นเวลา 21 วัน พบว่าข้าวอมิโลสต่ำ จะทำให้อัลกอฮอล์สูงสุด รองลงมาคืออมิโลสปานกลาง และสูงตามลำดับ สอดคล้องกับวรรัตน์ (2539) อ้างถึงรายงานของลูกจันทร์ (2535) กล่าวว่าข้าวที่เหมาะสมสำหรับการทำสาเกควรเป็นข้าวที่มีอมิโลสต่ำ เช่น ข้าวเหนียว เพราะเมื่อนึ่งสุกจะมีลักษณะอ่อนนุ่มไม่แน่นทำให้เชื้อราเจริญได้ดี และการทำงานของเอนไซม์จะมีประสิทธิภาพสูงให้กลิ่นรสที่ดีกว่าการใช้ข้าวเจ้า

ชไมธร และคณะ (2548) ได้ทำโดยการคัดเลือกจุลินทรีย์จากลูกแบ่งเหล้าและลูกแบ่งข้าวหมากจำนวน 44 ตัวอย่าง เพื่อหาจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์อะไมเลสสูงสุด พบเชื้อจุลินทรีย์ที่ให้เอนไซม์สูงสุด 32 หน่วยต่อมิลลิลิตร เป็นเชื้อรา นอกจากนี้พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อดังกล่าวคือ 30 องศาเซลเซียส เมื่อนำมาทดลองหมักข้าวโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ที่คัดเลือกได้ พบว่าการใช้หัวเชื้อ 10 % ที่ความหนาของข้าว 3 นิ้ว จะให้ปริมาณน้ำตาลสูงสุดในระยะเวลา 96 ชั่วโมง

อุปกรณ์และวิธีการ

1. อุปกรณ์

- 1.1 กล้องจุลทรรศน์ (Olympus optical: CO 11)
- 1.2 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator: Heraeus B12)
- 1.3 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven: WTB Binder BD 115)
- 1.4 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave: Hirayama HV 50)
- 1.5 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Boiling water bath: Polyscience 8306)
- 1.6 Hot plate (Corning Hot Plate Stirrer PC-351)
- 1.7 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical balance : Sartorius LA 230S)
- 1.8 เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Analytical balance : Sartorius BP 610)
- 1.9 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter : Metrohm 744)
- 1.10 เครื่องผสม (Vortex: Genie 2™ G-560E)
- 1.11 เครื่องวัดปริมาณอัลกอฮอลล์ (Ebulliometer)
- 1.12 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer: Perkin Elmer Lambda 2)
- 1.13 เครื่องวัดค่าสี (Colorimeter: Juki Tri-Stimulus Colorimeter JC801)

2. วิธีการ

2.1 ศึกษาผลของการปฏิบัติเบื้องต้นต่อกระบวนการหมัก

- 2.1.1 แช่วัวเหี่ยวพันธุ์ กข 6 ในน้ำ 12 ชั่วโมง แล้วนึ่งให้สุกด้วยลังถึงจนเมล็ดขาวใส
- 2.1.2 แบ่งข้าวเหี่ยวออกสองส่วนเท่าๆกัน ส่วนหนึ่งล้างน้ำจนหมดยาง อีกส่วนหนึ่งไม่ล้างน้ำ แบ่งข้าวเหี่ยวหนึ่งทั้งสองแบบใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 600 มิลลิลิตร บีกเกอร์ละ 200 กรัม
- 2.1.3 เติม spore suspension ของเชื้อรา *Rhizopus* sp. N44-E (ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้) ที่ความเข้มข้น 1.0×10^6 สปอร์/มล ลงไปปริมาตรร้อยละ 10 บ่มที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30°C เป็นเวลา 7 วัน
- 2.1.4 วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Miller, 1959)

2.2 ศึกษาปริมาณสปอร์ที่เหมาะสมต่อกระบวนการหมัก

2.2.1 แช่ข้าวเหนียวในน้ำ 12 ชั่วโมง แล้วนึ่งให้สุกด้วยลังถึง

2.2.2 แบ่งข้าวเหนียวหนึ่งทีผ่านการล้างน้ำจนหมดยางใส่ลงในปิกเกอร์ขนาด 600 มิลลิลิตร ปิกเกอร์ละ 200 กรัม

2.2.3 เติม spore suspension ของเชื้อราที่ความเข้มข้นต่างกันคือที่ความเข้มข้นของ สปอร์ 1.0×10^6 , 1.0×10^7 และ 1.0×10^8 สปอร์/มล ลงไปปริมาตรร้อยละ 10

2.2.4 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30°C เป็นเวลา 7 วัน

2.2.5 วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Miller, 1959)

2.3 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ใช้ต่อกระบวนการหมัก

2.3.1 แช่ข้าวเหนียวในน้ำ 12 ชั่วโมง แล้วนึ่งให้สุกด้วยลังถึง

2.3.2 ล้างน้ำข้าวเหนียวจนหมดยาง บรรจุข้าวเหนียวหนึ่งลงในปิกเกอร์ขนาด 600 มิลลิลิตร ปิกเกอร์ละ 200 กรัม

2.3.3 เติม spore suspension ของเชื้อราที่ความเข้มข้น 1.0×10^7 สปอร์/มล ลงไป ปริมาตรร้อยละ 10 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25°C , 30°C และ 37°C เป็นเวลา 7 วัน

2.3.4 วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Miller, 1959)

2.4 ศึกษากระบวนการหมักอัลกอฮอล์

2.4.1 เตรียมน้ำเชื่อมข้าวเหนียวโดยปรับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำเชื่อมให้มีค่าร้อยละ 24-26 ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ของน้ำหมักให้มีค่าเท่ากับ 4.0

2.4.2 ฆ่าเชื้อโดยโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟท์ (potassium metabisulfite : KMS) 150 พีพีเอ็ม ทิ้งไว้นาน 24 ชั่วโมง

2.4.3 เติมเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ให้มีความเข้มข้นในน้ำหมักประมาณ $1.0 - 6.0 \times 10^6$ เซลล์/มล บ่มที่อุณหภูมิ 30°C จนสิ้นสุดกระบวนการหมัก

2.4.4 เก็บตัวอย่างทุกๆ 2 วัน นำไปวิเคราะห์ ปริมาณอัลกอฮอล์โดย Ebulliometer, ปริมาณยีสต์ช่วงหมักอัลกอฮอล์ โดยวิธี spread plate และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Miller, 1959)

2.4.5 เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก เติม KMS 150 พีพีเอ็ม ลงในขวดหมัก ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้วแยกเอาส่วนที่เป็นน้ำใสออกมาเก็บไว้ในขวดแก้วปราศจากเชื้อ

2.5 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกตะกอนละเอียดออกจากไวน์หวาน

ทำการแยกเอาตะกอนที่แขวนลอยในน้ำหมักด้วย 2 วิธีการคือ

2.5.1 การตกตะกอนด้วยอุณหภูมิต่ำ

นำน้ำหมักที่ได้จากข้อ 4.8 มาตั้งทิ้งไว้ในห้องเย็นอุณหภูมิ 4°C นาน 2 สัปดาห์ แล้วถ่ายน้ำใสส่วนบนนำมาวัดค่าสีด้วยเครื่องวัดสี (Juki Tri-Stimulus Colorimeter) และวิเคราะห์ปริมาณอัลกอฮอล์โดย Ebulliometer

2.5.2 การกรองด้วยกระดาษกรอง

นำน้ำหมักที่ได้จากข้อ 4.8 มาทำการกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 น้ำของเหลวใส่ที่กรองได้ มาวัดค่าสีด้วยเครื่องวัดสี (Juki Tri-Stimulus Colorimeter) และวิเคราะห์ปริมาณอัลกอฮอล์โดย Ebulliometer



ผลการทดลอง

1. ศึกษาผลของการปฏิบัติเบื้องต้นต่อข้าวเหนียวต่อกระบวนการหมัก

จากการทดลองนำข้าวเหนียวหนึ่งสุกจำนวน 200 กรัม มาล้างน้ำและไม่ล้างน้ำ ก่อนนำมาคลุกกับผงสปอร์ของรา *Rhizopus sp.* N44-E ความเข้มข้นประมาณ 1.0×10^6 สปอร์/มล ปริมาตรร้อยละ 10 แล้วหมักในบีกเกอร์ขนาด 600 มล ณ อุณหภูมิห้องประมาณ 30°C นาน 7 วัน ได้ผลดังตารางที่ 4 และรูปภาพที่ 3 พบว่าข้าวเหนียวที่ผ่านการล้างน้ำแล้วอายุ 1 วันจะมีลักษณะนุ่มและมีความเปียกชื้นพอสมควร เมื่อกดกองข้าวเหนียวเบาๆ จะพบของเหลวหนืดเล็กน้อย สังเกตพบไอน้ำที่เกาะอยู่ในบีกเกอร์ และการเจริญของใยราจำนวนมากที่งอกจากสปอร์ น้ำเชื่อมเริ่มสังเกตเห็นได้ชัดในวันที่ 2 ของการหมัก และมีปริมาณเพิ่มขึ้นตลอดช่วงการหมักนาน 7 วัน การเพิ่มขึ้นของปริมาณน้ำเชื่อมแปรผันตามลักษณะนุ่มและละของกองข้าวเหนียว น้ำเชื่อมมีน้ำตาลรีดิวส์เป็นส่วนประกอบ ดังรูปภาพที่ 4 พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวส์มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 5 วันแรกของการหมัก และมีค่าร้อยละ 24.43 ในวันสุดท้ายของการหมัก

สำหรับข้าวเหนียวที่ไม่ผ่านการล้างน้ำ จะพบข้าวเหนียวมีลักษณะแห้งและแข็งตัวลงเรื่อยๆ และไม่พบน้ำเชื่อมใสบีกเกอร์ตลอดระยะเวลาการหมักนาน 7 วัน ยกเว้นของเหลวหนืดเล็กน้อยเมื่อกดกองข้าวเหนียวให้ยุบตัวลง ของเหลวหนืดดังกล่าวคือน้ำเชื่อมที่มีน้ำตาลรีดิวส์ ปริมาตรร้อยละ 8.45 เมื่อสิ้นสุดการหมัก

ตารางที่ 4 การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักข้าวเหนียวที่ผ่านการล้างน้ำและไม่ผ่านการล้างน้ำก่อนนำไปหมักด้วยรานาน 7 วัน

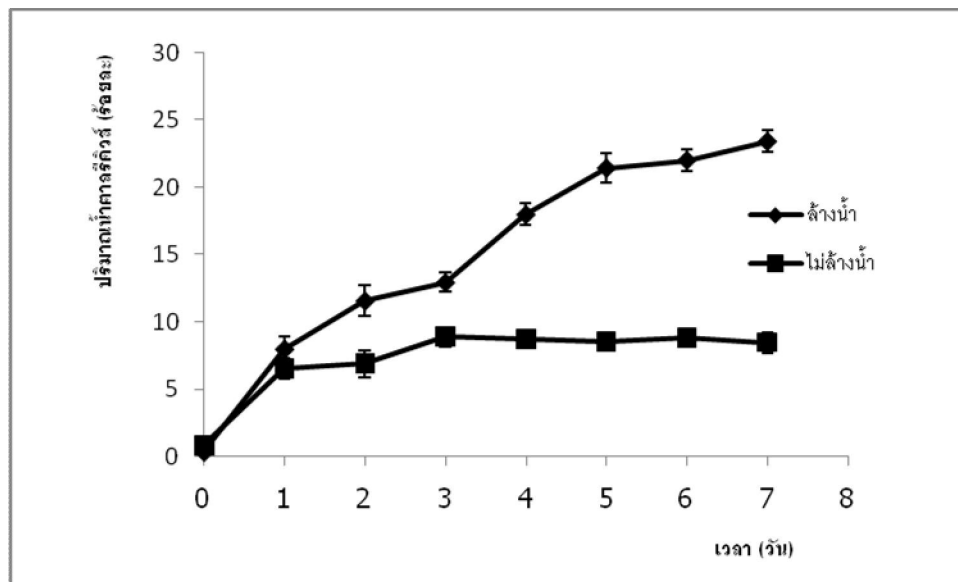
ระยะเวลา (วัน)	การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ	
	ข้าวเหนียวที่ผ่านการล้างน้ำ	ข้าวเหนียวที่ไม่ผ่านการล้างน้ำ
1	-สปอร์เริ่มงอกเส้นใย ข้าวเหนียวมีลักษณะนุ่มและชื้นตรงบริเวณด้านล่างของกอง เมื่อกดกองข้าวเหนียวจะพบของเหลวหนืด พบไอน้ำภายในบีกเกอร์ และมีกลิ่นหอม	-สปอร์เริ่มงอกเส้นใยแต่เส้นใยมีน้อยกว่าแบบล้างน้ำ ข้าวเหนียวบางส่วนเริ่มมีลักษณะแข็งและแห้ง และมีกลิ่นหอม เมื่อกดกองข้าวเหนียวจะพบของเหลวหนืดแต่มีปริมาณน้อยมาก

ตารางที่ 4 (ต่อ)

ระยะเวลา (วัน)	การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ	
	ข้าวเหนียวที่ผ่านการล้างน้ำ	ข้าวเหนียวที่ไม่ผ่านการล้างน้ำ
2	-เส้นใยของราเจริญเพิ่มขึ้น ข้าวเหนียวด้านล่างของกองมีลักษณะอ่อนตัวลงเล็กน้อย เกิดน้ำเชื่อมลักษณะใสระดับความสูงของน้ำเชื่อมประมาณ 1/5 ของกองข้าวเหนียว และมีกลิ่นหอม	-เส้นใยของราเจริญเพิ่มขึ้น ข้าวเหนียวมีลักษณะแข็งและแห้งเพิ่มขึ้นโดยเฉพาะส่วนบน และมีกลิ่นหอม
3	-เส้นใยเส้นใยของราเจริญได้ดีที่บริเวณส่วนบนของกองข้าวเหนียว ระดับความสูงของน้ำเชื่อมประมาณ 1/3 ของกองข้าวเหนียว และมีกลิ่นหอม	-เส้นใยของราเจริญเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ข้าวเหนียวมีลักษณะแข็งและแห้งเพิ่มขึ้นอีก และมีกลิ่นหอม
4	-เส้นใยของราส่วนใหญ่มีลักษณะเปียก ระดับความสูงของน้ำเชื่อมประมาณ 2/3 ของกองข้าวเหนียว น้ำเชื่อมเริ่มขุ่นเล็กน้อย และมีกลิ่นหอม	-เส้นใยของรา มีลักษณะเหมือนหยดการเจริญ ข้าวเหนียวมีลักษณะแข็งและแห้งเพิ่มขึ้นอีก และมีกลิ่นหอม
5	-เส้นใยของราส่วนใหญ่มีลักษณะเปียก ระดับความสูงของน้ำเชื่อมเพิ่มขึ้นประมาณ 3/4 ของกองข้าวเหนียว ที่ลอยตัวสูงขึ้นจากก้นปึกเกอร์ น้ำเชื่อมขุ่นเล็กน้อย และมีกลิ่นหอม	-ข้าวเหนียวมีลักษณะแข็งและแห้งเพิ่มขึ้นอีก และมีกลิ่นหอม
6	-น้ำเชื่อมมีระดับความสูงเพิ่มขึ้นประมาณ 3/4 ของกองข้าวเหนียวที่ลอยตัวสูงขึ้นจากก้นปึกเกอร์ และมีกลิ่นหอม	-ข้าวเหนียวมีลักษณะแข็งและแห้งเพิ่มขึ้นอีก และมีกลิ่นหอม
7	-น้ำเชื่อมมีระดับความสูงเพิ่มขึ้นประมาณ 3/4 ของกองข้าวเหนียวที่ลอยตัวสูงขึ้นกว่าเดิมจากก้นปึกเกอร์ และมีกลิ่นหอม	-ข้าวเหนียวมีลักษณะแข็งและแห้งมาก และมีกลิ่นหอม



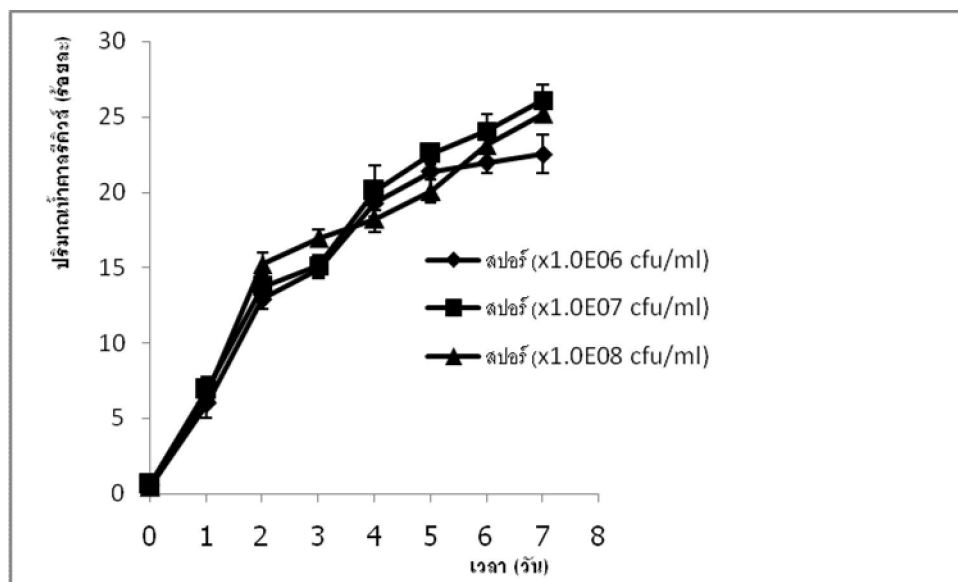
รูปภาพที่ 3 การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักข้าวเหนียวที่ผ่านการล้างน้ำ และไม่ผ่านการล้างน้ำก่อนนำไปหมักด้วยรา: ข้าวเหนียวที่ผ่านการล้างน้ำก่อนคลุกสปอร์รา (ก) และข้าวเหนียวที่ไม่ผ่านการล้างน้ำ (ข)



รูปภาพที่ 4 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการหมักข้าวเหนียวด้วยวิธีการล้างน้ำข้าวเหนียวก่อนคลุกสปอร์ราและวิธีการไม่ล้างน้ำข้าวเหนียว

2. ศึกษาปริมาณสปอร์ที่เหมาะสมต่อกระบวนการหมัก

เมื่อนำข้าวเหนียวหนึ่งทีผ่านการล้างน้ำหนัก 200 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 600 มิลลิลิตร และเติม spore suspension ของเชื้อราที่ความเข้มข้นประมาณ 1.0×10^6 , 1.0×10^7 และ 1.0×10^8 สปอร์/มล ปริมาตรร้อยละ 10 ณ แล้วทำการหมัก ณ อุณหภูมิห้องประมาณ 30°C นาน 7 วัน ผลดังรูปภาพที่ 5 พบว่าการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพเป็นไปในลักษณะเดียวกับการหมักข้าวเหนียวในการทดลองที่ 1 (ตารางที่ 4) เช่นเดียวกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นแปรผันตามระยะเวลาการหมักทุกความเข้มข้นของสปอร์ที่ใช้ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ดังกล่าวมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 2 วันแรกของการหมัก และค่อยๆ ลดลงเล็กน้อยโดยเฉพาะในช่วงสุดท้ายของการหมัก เมื่ออายุการหมักครบ 7 วัน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้มีค่าร้อยละ 22.52 26.07 และ 25.18 ตามลำดับ ซึ่งการใช้สปอร์เข้มข้น 1.0×10^6 สปอร์/มล ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่ำกว่าการใช้ความเข้มข้นของสปอร์เท่ากับ 1.0×10^7 และ 1.0×10^8 สปอร์/มล



รูปภาพที่ 5 ปริมาณน้ำตาลที่ละลายที่เกิดขึ้นจากการหมักข้าวเหนียว เมื่อเติมสปอร์ในปริมาณที่แตกต่างกัน

3. ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกระบวนการหมัก

เมื่อนำข้าวเหนียวหนึ่งหนัก 200 กรัม มาบรรจุลงในบีกเกอร์ขนาด 600 มิลลิลิตร และเติม spore suspension ของเชื้อราที่ความเข้มข้น 1.0×10^7 สปอร์/มล ปริมาณร้อยละ 10 แล้วทำการหมักที่อุณหภูมิ 25°C , 30°C และ 37°C นาน 7 วัน ผลดังตารางที่ 5 และรูปภาพที่ 6 พบว่าการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพระหว่างกระบวนการหมักมีความคล้ายคลึงกัน โดยน้ำเชื่อมเริ่มเกิดขึ้นที่ทุกอุณหภูมิทดลองในวันที่ 2 ของการหมัก แต่ลักษณะและสีของน้ำเชื่อมที่ได้เริ่มมีความแตกต่างกันในวันที่ 4 ของการหมัก คือ น้ำเชื่อมที่ได้จากการหมักที่อุณหภูมิ 25°C และ 30°C จะได้น้ำเชื่อมที่มีสีเหลืองใส ในขณะที่อุณหภูมิ 37°C น้ำเชื่อมจะมีสีเหลืองและมีลักษณะขุ่นเล็กน้อย ปริมาณน้ำเชื่อมและความขุ่นจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการหมัก น้ำเชื่อมที่เกิดขึ้นมีปริมาณมากเกือบสูงท่วมกองข้าวเหนียวและทำให้กองข้าวเหนียวลอยตัวสูงขึ้นจากก้นบีกเกอร์ น้ำตาลที่ละลายที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักมีปริมาณเพิ่มขึ้นในทุกระดับอุณหภูมิที่ทำการทดลอง ผันแปรไปตามระยะเวลาของการหมัก ดังรูปภาพที่ 7 ที่อุณหภูมิ 25°C น้ำตาลที่ละลายจะเกิดขึ้นในปริมาณที่ต่ำกว่าที่อุณหภูมิ 30°C และ 37°C ปริมาณน้ำตาลที่ละลายในวันที่ 7 ของการหมักมีค่าประมาณร้อยละ 19.11, 24.46 และ 23.41 ตามลำดับ

ตารางที่ 5 การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักข้าวเหนียวที่อุณหภูมิแตกต่างกัน

ระยะเวลา (วัน)	การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของข้าวเหนียวที่อุณหภูมิ		
	25 ⁰ C	30 ⁰ C	37 ⁰ C
1	-สปอร์เริ่มงอกเส้นใย ข้าวเหนียวมีลักษณะนุ่มและชื้นมากตรงบริเวณด้านล่างของกอง และมีกลิ่นหอม	-สปอร์เริ่มงอกเส้นใย ข้าวเหนียวมีลักษณะนุ่มและชื้นมากตรงบริเวณด้านล่างของกอง และมีกลิ่นหอม	-สปอร์เริ่มงอกเส้นใย ข้าวเหนียวมีลักษณะนุ่มและชื้นมากตรงบริเวณด้านล่างของกอง และมีกลิ่นหอม
2	-เส้นใยของราเจริญเล็กน้อย เริ่มเกิดน้ำเชื่อมใส และมีกลิ่นหอม	-เส้นใยของราเจริญเพิ่มขึ้น เริ่มเกิดน้ำเชื่อมใส และมีกลิ่นหอม	-เส้นใยของราเจริญเพิ่มขึ้น เริ่มเกิดน้ำเชื่อมใส และมีกลิ่นหอม
3	-เส้นใยของราเจริญเล็กน้อย เกิดน้ำเชื่อมใส เพิ่มขึ้น และมีกลิ่นหอม	-เส้นใยของราเจริญเล็กน้อย น้ำเชื่อมมีปริมาณเพิ่มขึ้น และมีกลิ่นหอม	-เส้นใยของราเจริญเล็กน้อย น้ำเชื่อมมีปริมาณเพิ่มขึ้น และมีกลิ่นหอม
4	-ไม่สังเกตเห็นการเจริญของเส้นใยรา น้ำเชื่อมมีปริมาณเพิ่มขึ้น และมีกลิ่นหอม	-ไม่สังเกตเห็นการเจริญของเส้นใยรา น้ำเชื่อมมีปริมาณเพิ่มขึ้นมีสีเหลืองใส และมีกลิ่นหอม	-ไม่สังเกตเห็นการเจริญของเส้นใยรา น้ำเชื่อมมีปริมาณเพิ่มขึ้นมีสีเหลืองและขุ่นเล็กน้อย และมีกลิ่นหอม
5	-น้ำเชื่อมมีปริมาณเพิ่มขึ้นและเริ่มขุ่น เมล็ดข้าวเหนียวเกาะตัวกันและลอยขึ้นเล็กน้อยจากก้นปึกเกอร์ และมีกลิ่นหอม	-น้ำเชื่อมมีปริมาณเพิ่มขึ้นมีสีเหลืองใส และมีกลิ่นหอม เมล็ดข้าวเหนียวเกาะตัวกันและลอยขึ้นจากก้นปึกเกอร์	-น้ำเชื่อมมีปริมาณเพิ่มขึ้นมีสีเหลืองและขุ่น มีกลิ่นหอม เมล็ดข้าวเหนียวเกาะตัวกันและลอยขึ้นจากก้นปึกเกอร์

ตารางที่ 5 (ต่อ)

ระยะเวลา (วัน)	การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของข้าวเหนียวที่อุณหภูมิ		
	25 ⁰ C	30 ⁰ C	37 ⁰ C
6	-น้ำเชื่อมมีปริมาณเพิ่มขึ้น และชุ่ม เมล็ดข้าวเหนียว เกาะตัวกันและลอยขึ้นจาก ก้นปิกเกอร์ และมีกลิ่นหอม	-น้ำเชื่อมมีปริมาณ เพิ่มขึ้น และมีกลิ่นหอม เมล็ดข้าวเหนียวเกาะตัว กันและลอยขึ้นจากก้นปิกเกอร์	-น้ำเชื่อมมีปริมาณ เพิ่มขึ้น และมีกลิ่นหอม เมล็ดข้าวเหนียวเกาะตัว กันและลอยขึ้นจากก้นปิกเกอร์
7	-น้ำเชื่อมมีปริมาณเพิ่มขึ้น เกือบทั่วกองข้าวเหนียว และชุ่ม เมล็ดข้าวเหนียว เกาะตัวกันและลอยขึ้นจาก ก้นปิกเกอร์	-น้ำเชื่อมมีปริมาณ เพิ่มขึ้นเกือบทั่วกองข้าว เหนียวและชุ่ม มีกลิ่น หอม เมล็ดข้าวเหนียว เกาะตัวกันและลอยขึ้น จากก้นปิกเกอร์	-น้ำเชื่อมมีปริมาณ เพิ่มขึ้นเกือบทั่วกองข้าว เหนียวและชุ่ม มีกลิ่น หอม เมล็ดข้าวเหนียว เกาะตัวกัน และลอยขึ้น จากก้นปิกเกอร์



อุณหภูมิ 25⁰C

(ก)



อุณหภูมิ 30⁰C

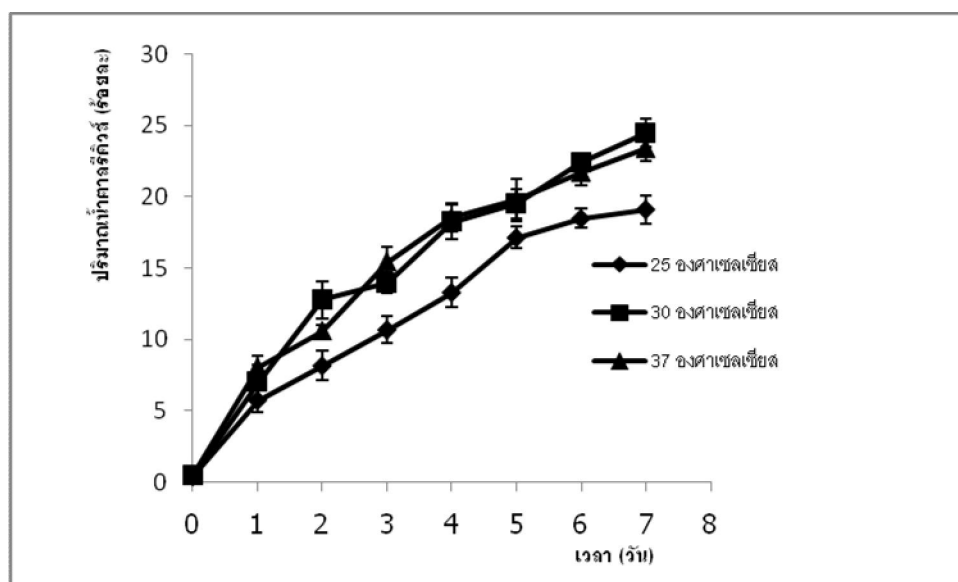
(ข)



อุณหภูมิ 37⁰C

(ค)

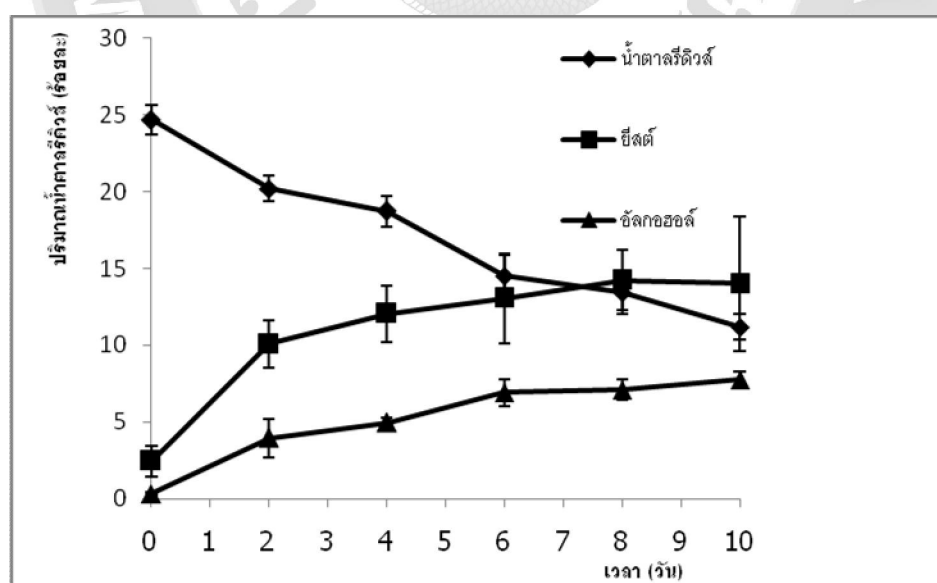
รูปภาพที่ 6 น้ำเชื่อมที่ผลิตจากการหมักข้าวเหนียว ณ อุณหภูมิการหมักที่แตกต่างกัน 3 ระดับ: 25⁰C (ก), 30⁰C (ข) และ 37⁰C



รูปภาพที่ 7 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นเมื่อหมักที่อุณหภูมิแตกต่างกัน

4. ศึกษากระบวนการหมักอัลกอฮอล์

เมื่อนำข้าวเหนียวหนึ่งมาทำการหมักเพื่อให้ได้น้ำเชื่อม แล้วแยกเอาน้ำเชื่อมมาปรับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ให้มีค่าประมาณร้อยละ 25 แล้วเติมยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ให้มีความเข้มข้นประมาณ $1.0-6.0 \times 10^6$ เซลล์/มล ของน้ำหมัก ผลดังรูปภาพที่ 8 พบว่าน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น



รูปภาพที่ 8 การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของน้ำหมักในระหว่างการหมักไวน์

ลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 2 วันแรกของการหมัก และยังคงมีปริมาณลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงวันสุดท้ายของการหมักโดยมีน้ำตาลรีดิวซ์เหลือประมาณร้อยละ 11.19 ยีสต์และอัลกอฮอล์มีปริมาณเพิ่มขึ้น โดยยีสต์มีอัตราการเจริญแบบทวีคูณจนถึงวันที่ 2 ของการหมัก และมีจำนวนเท่ากับ 1.0×10^7 cfu/ml ปริมาณยีสต์เกือบคงที่จนถึงสิ้นสุดระยะเวลาหมักในวันที่ 10 (รูปภาพที่ 9) ในขณะเดียวกันพบว่าอัลกอฮอล์ถูกผลิตขึ้นในระหว่างการหมัก และมีปริมาณสุดท้ายประมาณร้อยละ 7.77 (ปริมาตร/ปริมาตร)



รูปภาพที่ 9 ไวน์หวานที่หมักจากน้ำเชื่อมข้าว

5. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกตะกอนละเอียดออกจากไวน์หวาน

ศึกษาการแยกตะกอนออกจากน้ำหมักที่ได้ด้วยการแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4°C นาน 2 สัปดาห์ และด้วยวิธีการกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No. 1 แล้วนำไปวัดค่าสี และปริมาณอัลกอฮอล์ ได้ผลดังตารางที่ 6 พบว่า การแช่เย็นไวน์หวานที่อุณหภูมิ 4°C นาน 2 สัปดาห์ จะได้ของเหลวที่มีสี

ตารางที่ 6 ค่าสีและปริมาณอัลกอฮอล์ของไวน์หวานที่ผ่านการแยกตะกอนด้วยวิธีการแช่เย็นและวิธีการกรอง

สิ่งทดลอง	ค่าสี			ปริมาณอัลกอฮอล์ (ร้อยละ)
	L*	a*	b*	
การแช่เย็นที่ 4°C	95.01 ± 0.20	23.97 ± 0.08	10.38 ± 0.45	7.67 ± 0.67
การกรอง	95.50 ± 0.55	24.88 ± 0.47	10.35 ± 0.40	7.43 ± 0.41

เหลืองใส มีค่าความสว่าง (L^*) ค่าสีเขียว-แดง (a^*) และค่าสีน้ำเงิน-เหลือง (b^*) เท่ากับ 95.01, 23.97 และ 10.38 ตามลำดับ ปริมาณอัลกอฮอลล์ที่ได้มีค่าร้อยละ 7.67 ในขณะที่การใช้วิธีการกรองผ่านกระดาษกรองจะได้ของเหลวที่มีสีเหลืองใส มีค่าสีเท่ากับ ค่าความสว่าง, ค่าสีเขียว-แดง และค่าสีน้ำเงิน-เหลืองเท่ากับ 95.5, 24.88 และ 10.35 ตามลำดับ ปริมาณอัลกอฮอลล์ที่ได้มีค่าร้อยละ 7.43



วิจารณ์ผล

1. ศึกษาผลของการปฏิบัติเบื้องต้นต่อข้าวเหนียวต่อกระบวนการหมัก

ข้าวเหนียวที่ผ่านการล้างน้ำแล้วอายุ 1 วันจะมีลักษณะนุ่มและมีความเปียกชื้นพอสมควร เมื่อกดกองข้าวเหนียวเบาๆ จะพบของเหลวหนืดเล็กน้อย ทั้งนี้เนื่องมาจากความชื้นที่เกิดขึ้นที่เกิดจากน้ำที่ใช้ล้างบางส่วนติดมากับกองข้าวเหนียว จากกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสและกลูโคอะไมเลส *Rhizopus sp.* N44-E ที่ทำการย่อยสลายแป้งที่เป็นองค์ประกอบของข้าวเหนียวให้มีโมเลกุลขนาดเล็กลง และมีน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้น ทำให้แป้งบางส่วนกลายสภาพเป็นของเหลว (Koizumi, 2003; Soni และ Gupta, 2003) และจากการหายใจของรา ซึ่งสามารถสังเกตเห็นการงอกของเส้นใยได้อย่างชัดเจน ปริมาณของเหลวหรือน้ำเชื่อมจะเริ่มสังเกตเห็นได้ชัดในวันที่ 2 ของการหมัก และมีปริมาณเพิ่มขึ้นตลอดช่วงการหมักนาน 7 วัน การเพิ่มขึ้นของปริมาณน้ำเชื่อมแปรผันตามลักษณะนุ่มและละเอียดของกองข้าวเหนียว นอกจากนั้นยังพบน้ำตาลรีดิวซ์มีปริมาณเพิ่มขึ้น ผลดังรูปภาพที่ 4 พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 5 วันแรกของการหมัก และมีค่าร้อยละ 24.43 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในวันสุดท้ายของการหมัก

สำหรับข้าวเหนียวที่ไม่ผ่านการล้างน้ำ จะพบข้าวเหนียวมีลักษณะแห้งและแข็งตัวลงเรื่อยๆ และไม่พบน้ำเชื่อมใสที่ก้นปิกเกอร์ตลอดระยะเวลาการหมักนาน 7 วัน ยกเว้นของเหลวหนืดเล็กน้อยเมื่อกดกองข้าวเหนียวให้ยุบตัวลง ของเหลวหนืดดังกล่าวคือน้ำเชื่อมที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ปริมาณร้อยละ 8.45 เมื่อสิ้นสุดการหมัก ซึ่งเป็นระดับที่ต่ำมากเมื่อเทียบกับปริมาณที่พบในข้าวเหนียวที่ผ่านการล้างน้ำ ซึ่งอาจเนื่องมาจากข้าวเหนียวที่ไม่ผ่านการล้างน้ำได้สูญเสียความชื้นมากเกินไป จนทำให้เส้นใยของราเจริญได้ไม่ดี ส่งผลให้การผลิตเอนไซม์กลุ่มอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสของราอยู่ในระดับต่ำตามไปด้วย

2. ศึกษาปริมาณสปอร์ที่เหมาะสมต่อกระบวนการหมัก

การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของข้าวเหนียวที่หมักด้วยสปอร์ของรา เป็นไปในลักษณะเดียวกับการหมักข้าวเหนียวในการทดลองที่ 1 เช่นเดียวกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นแปรผันตามระยะเวลาการหมักทุกความเข้มข้นของสปอร์ที่ใช้ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ดังกล่าวมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 2 วันแรกของการหมัก และค่อยๆ ลดลงเล็กน้อยโดยเฉพาะในช่วงสุดท้ายของการหมัก พบว่าเมื่ออายุการหมักครบ 7 วัน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้มีค่าร้อยละ 22.52 26.07 และ 25.18 ตามลำดับ ซึ่งการใช้สปอร์เข้มข้น 1.0×10^7 สปอร์/มล จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของชไมธร (2548) ที่รายงานการใช้สปอร์ *Rhizopus sp.* N44-E เข้มข้น

1.0×10^7 สปอร์/มล ปริมาณร้อยละ 10 ในการหมักข้าวเหนียวเพื่อให้ได้น้ำเชื่อม และพบว่าสปอร์ที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าวสามารถให้กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดเมื่อการหมักดำเนินไปได้ 4 วัน ในการทดลองครั้งนี้ปริมาณสปอร์ที่ 1.0×10^8 สปอร์/มล ไม่ได้ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่สูงกว่า ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสปอร์รามีการงอกมากเกินไป จนทำให้เกิดการแย่งใช้สารอาหารเช่นน้ำตาลรีดิวส์ที่ได้จากการไฮโดรไลซ์แป้ง

3. ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกระบวนการหมัก

การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพระหว่างกระบวนการหมักที่อุณหภูมิ 25°C , 30°C และ 37°C มีความคล้ายคลึงกัน โดยน้ำเชื่อมเริ่มเกิดขึ้นที่ทุกอุณหภูมิทดลองในวันที่ 2 ของการหมัก แต่ลักษณะและสีของน้ำเชื่อมที่ได้เริ่มมีความแตกต่างกันในวันที่ 4 ของการหมัก คือ น้ำเชื่อมที่ได้จากการหมักที่อุณหภูมิ 25°C และ 30°C จะได้น้ำเชื่อมที่มีสีเหลืองใส ในขณะที่อุณหภูมิ 37°C น้ำเชื่อมจะมีสีเหลืองและมีลักษณะขุ่นเล็กน้อย ปริมาณน้ำเชื่อมและความขุ่นจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการหมัก ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากแป้งในข้าวเหนียวที่อยู่ในสภาพของแข็งได้ถูกเอนไซม์กลุ่มอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสไฮโดรไลซ์จนได้สารประกอบที่มีโมเลกุลสั้นลง น้ำเชื่อมที่เกิดขึ้นมีปริมาณมากเกือบสูงท่วมกองข้าวเหนียวและทำให้กองข้าวเหนียวลอยตัวสูงขึ้นจากก้นปึกเกอร์ น้ำตาลรีดิวส์ที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักมีปริมาณเพิ่มขึ้นในทุกระดับอุณหภูมิที่ทำการทดลอง ผันแปรไปตามระยะเวลาของการหมัก แต่อุณหภูมิ 30°C จะเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดของการหมักเพราะจะทำให้ได้น้ำตาลรีดิวส์สูงถึงร้อยละ 24.46 ในขณะที่อุณหภูมิ 25°C และ 37°C จะให้น้ำตาลรีดิวส์ร้อยละ 19.11 และ 23.41 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของชไมธร (2548) ที่กล่าวว่ากิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสของรา *Rhizopus sp.* N44-E จะมีค่าสูงสุดประมาณ 28.62 หน่วย/มล ที่อุณหภูมิ 30°C แต่กิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าวจะมีค่าลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 30°C

4. ศึกษากระบวนการหมักอัลกอฮอล์

น้ำตาลรีดิวส์เริ่มต้นลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 2 วันแรกของการหมักและยังคงมีปริมาณลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงวันสุดท้ายของการหมักโดยมีน้ำตาลรีดิวส์เหลือประมาณร้อยละ 11.19 ซึ่งสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของปริมาณยีสต์และปริมาณอัลกอฮอล์ โดยยีสต์มีอัตราการเจริญแบบทวีคูณจนถึงวันที่ 2 ของการหมัก โดยมีจำนวนเท่ากับ 1.0×10^7 cfu/ml และมีค่าเกือบคงที่จนถึงสิ้นสุดระยะเวลาหมักในวันที่ 10 เนื่องจากยีสต์เริ่มขาดแคลนสารอาหารที่จำเป็นในการดำรงชีพ ประกอบกับปริมาณอัลกอฮอล์ที่ถูกร้างขึ้นจากน้ำตาลรีดิวส์ในน้ำหมัก ซึ่งพบว่าปริมาณอัลกอฮอล์วันสุดท้ายของการหมักมีค่าประมาณร้อยละ 7.77 (ปริมาตร/ปริมาตร)

5. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกตะกอนละเอียดออกจากไวน์หวาน

การแยกตะกอนละเอียดโดยการแช่เย็นไวน์หวานที่ได้ ณ อุณหภูมิ 4°C นาน 2 สัปดาห์ จะให้ผลลัพธ์ที่ไม่แตกต่างจากวิธีการกรองไวน์หวานด้วยกระดาษกรอง โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีสีเหลืองใส ไวน์หวานที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C มีค่าความสว่าง (L^*) ค่าสีเขียว-แดง (a^*) และค่าสีน้ำเงิน-เหลือง (b^*) เท่ากับ 95.01, 23.97 และ 10.38 ตามลำดับ ในขณะที่การใช้วิธีการกรองผ่านกระดาษกรองจะได้ของเหลวที่มีค่าความสว่าง, ค่าสีเขียว-แดง และค่าสีน้ำเงิน-เหลืองเท่ากับ 95.5, 24.88 10.35 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของชไมธร (2549) ที่พบว่าการเก็บไวน์ข้าวไร่ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 2 สัปดาห์ จะสามารถทำให้ไวน์ใสขึ้นจากเดิมโดยค่าความขุ่นจะลดลงจาก 10.4 NTU เหลือเพียง 2.46 NTU วิธีการแยกตะกอนทั้งสองวิธีการไม่มีผลต่อปริมาณอัลกอฮอล์ในไวน์หวานโดยปริมาณอัลกอฮอล์ที่ได้มีค่าร้อยละ 7.67 ปริมาณอัลกอฮอล์ที่ได้มีค่าร้อยละ 7.43 ตามลำดับ



สรุปผล

1. ข้าวเหนียวที่ผ่านการล้างน้ำก่อนหมักด้วยสปอร์รา *Rhizopus sp. N44-E* ให้ผลลัพธ์ในการผลิตน้ำเชื่อมที่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวส์สูงสุดคือ ร้อยละ 24.43 เมื่ออายุการหมักนาน 7 วัน
2. ปริมาณกล้าเชื้อที่เหมาะสมต่อการหมักในรูป spore suspension มีค่าในช่วง 1.0×10^7 – 1.0×10^8 สปอร์/มล โดยจะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ในช่วงร้อยละ 25.18 - 26.07
3. อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการหมักอยู่ในช่วง 30°C - 37°C ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ในช่วงประมาณร้อยละ 24.46 - 23.41
4. การเติมยีสต์บริสุทธิ์ในน้ำเชื่อมที่ได้จากการหมักข้าวด้วยสปอร์ของรา และปรับให้มีปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ประมาณร้อยละ 25 จะได้ไวน์หวานที่มีอัลกอฮอล์ประมาณร้อยละ 7.77
5. การแยกตะกอนละเอียดออกจากไวน์หวานด้วยวิธีการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C และด้วยวิธีการจะทำให้ได้ไวน์หวานที่มีสีเหลืองใสและมีค่าของสีที่ใกล้เคียงกัน ในขณะที่เดียวกันก็ไม่ทำให้ไวน์หวานที่แยกตะกอนออกแล้วเกิดการสูญเสียปริมาณอัลกอฮอล์

เอกสารอ้างอิง

- โชคชัย วรรณ, นันทกร บุญเกิด และ ลำไพโร ดิษฐวิบูลย์. 2547. คนทำไวน์ (WINE MAKER I) สมบูรณ์พร้อมทั้ง กรุงเทพมหานคร.
- ชไมธร ชนระญาติ, สิทธิสิน บวรสมบัติ. สุพัตรา พิชัย และสกุณณี บวรสมบัติ. 2548. การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อราN44-E เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตไวน์ข้าว. เอกสารการประชุม สัมมนาวิชาการอุตสาหกรรมเกษตรครั้งที่ 7. กรุงเทพมหานคร
- ชไมธร ชนระญาติ. 2549. การผลิตมิรินจากเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดเลือกจากลูกแป้ง. เชียงใหม่: วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยแม่โจ้.
- นภา โล่ห์ทอง. 2535. กล้าเชื้ออาหารหมักและเทคโนโลยีการผลิต. กรุงเทพฯ. คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- มนตรี เชาว์นัสเสง. 2521. การคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์และราเพื่อผลิตไวน์ข้าว. กรุงเทพฯ: วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ยุพกนิษฐ์ พ่วงวีระกุล. 2546. กระบวนการผลิตสาโทและจุลินทรีย์ของสาโท. วารสารสถาบันอาหาร. ฉบับที่ 28 ปีที่ 5 มีนาคม – เมษายน.
- วรรณิ์ โชติวรรณพร . 2539 . การผลิตไวน์ข้าวเหนียวดำโดยการหมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์. กรุงเทพฯ: วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย .
- สุนันทา วงศ์ปิยชน . 2538 . การใช้ประโยชน์จากข้าวสำหรับการผลิตไวน์ข้าววิสกี้. กรุงเทพฯ: วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- อรองค์ นัยวิกุล. 2538. เคมีทางธัญญาหาร. กรุงเทพฯ: ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Green, P. J. 2002. Introduction to Food Biotechnology. Food Biotechnology Handbook from C.H.I.P.S., 1.
- Hondo, M., K. Maki, Y. Okumura and T. Yamaki. 2001. Preparation of a mirin-like sweetening made from potato (potato mirin). Food Science and Technology 48: 361-364.
- Ishikawa Y., Fukuda T., Kasukabe K., Tanida T., Tsukamoto Y. and Kawamura K." Method for preparing Mirin " JP1990000257227 May. 8, 1992.
- Koizumi, T. 2003. Traditional Japanese Food and the Mystery of Fermentation. Tokyo: Tokyo University of Agriculture.

- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid for estimation of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 31: 426-428.
- Oyashiki, H., M. Uchida, A. Obayashi and S. Oka. 1987. Mirin - making using long-life koji with low water content. *Journal of Fermentation Technology*. 65(6): 643-649
- Oyashiki, H., M. Uchida, A. Obayashi and S. Oka. 1988. Mirin-making at low alcohol Concentration with koji prepared with a new mutant of *Aspergillus usamii*. *Journal of Fermentation Technology*. 66(3): 333-339.
- Smith, J.E. and J.A. Pateman. 1977. The British Mycological Symposium Series No 1. Genetics and Physiology of *Aspergillus* : Oriental Food Uses of *Aspergillus*. Academic Press, London.
- Soni, S. K., A. Kaur and J. K. Gupta. 2003. A solid state fermentation based bacterial α -amylase and fungal glucoamylase system and its suitability for the hydrolysis of wheat starch. *Process Biochemistry*. 39: 185-192.
- Suprianto, Ohba R., Koga T. and Ueda S. 1989. Liquefaction of glutinous rice and aroma formation in tape preparation by ragi. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 67: 249-252.
- Takayama, T., H. Oyashi and T. Sakai. 1997. Immobilized glucose isomerase use in Mirin Production. *Journal Food Science*. 62: 237.
- Zhang, Y., Y. S. Li., Y. Z. Wang., C. K. Hu and S.X. Tang. 1997. Observations on the starch granula in the endosperm of waxy indica rices for wine-making using the scanning electron microscope. *Acta Agonomica Sinica*. 23(2): 237-241.
- Zhang X. 1982. Production of fang shao jui (rice wine) using improved koji-making and yeast culture. *Food and Fermentation Industries* ; part1.