รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากข้าวไทย

(Production of Fermented Vinegar from Thai Rice)

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นันทนิตย์ คงวัน

สนับสนุนโดย

สถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต

สัญญาเลขที่ 04/2547

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากข้าวไทย
(Production of Fermented Vinegar from Thai Rice)

ชื่อผู้วิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นันทนิตย์ คงวัน
สังกัด สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม
คณะเทคโนโลยีชีวภาพ

สนับสนุนโดย
สถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิตที่ให้ความอนุเคราะห์เงินงบประมาณในการดำเนินงานวิจัย ขอขอบคุณคณะกรรมการผู้พิจารณาการให้ทุนที่ให้โอกาสได้รับทุนอุดหนุนในครั้งนี้

ขอขอบคุณคณะเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยรังสิตที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่และอุปกรณ์จำเป็นที่ต้องใช้ในการวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ และนักศึกษาทุกท่านที่ทำหน้าที่เป็นผู้ช่วยวิจัย และอำนวยความสะดวก รวมทั้งให้ความร่วมมือในการแก้ไขปัญหาต่างๆให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี หากมีข้อผิดพลาดประการใดผู้วิจัยขอกราบอภัยมา ณ ที่นี้

นันทนิตย์ คงวัน

ผู้ดำเนินงานวิจัย

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ชื่อผู้วิจัย : ผศ. นันทนิตย์ คงวัน

ชื่อโครงงาน : การผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากข้าวไทย

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ใช้ปลายข้าว และข้าวเต็มเมล็ดของข้าวจ้าว ข้าวกล้อง และข้าวเหนียวขาวเป็นวัตถุ ดิบในการผลิตน้ำส้มสายชูหมัก กระบวนการผลิตแบ่งเป็น 2 ขั้นตอนคือ ขั้นตอนที่ 1 การผลิตแอล กอฮอล์หรือไวน์ข้าวจากข้าวแต่ละชนิดโดยใช้ลูกแป้ง ขั้นตอนที่ 2 เป็นการผลิตน้ำส้มสายชูหมักหรือกรดน้ำส้มจากไวน์ข้าวที่หมักได้จากขั้นตอนที่ 1 โดยใช้แบคทีเรียน้ำส้ม **Acetobacter aceti** TISIR 102

ขั้นตอนที่ 1 การผลิตแอลกอฮอล์จากข้าวแต่ละชนิด เริ่มจากการนำปลายข้าวไปแช่น้ำนาน 15-20 นาที เทน้ำทิ้ง แล้วนึ่งในไอน้ำเดือดนาน 30 นาที ถ้าใช้ข้าวเต็มเมล็ดต้องแช่นานถึง 6 ชั่วโมง และนึ่งนาน 30 นาที จากนั้นปล่อยทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ล้างเมือกออกด้วยน้ำ ผึ่งให้แห้ง นำไปผสมกับผงลูกแป้งในอัตราส่วนผงลูกแป้ง 7 กรัมน้ำหนักแห้ง ต่อข้าวนึ่ง 1 กิโลกรัม บรรจุลงในโหลแก้วทรงกลมที่มีความสูง 12 นิ้ว และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 นิ้ว ปิดปากโหลด้วยผ้าขาวบาง นำไปบ่ม ในที่ต่างๆกันดังนี้คือ ที่อุณหภูมิห้อง ในห้องเย็น(10°C) และในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 3 วัน จากนั้นทำการเติมน้ำเชื่อมที่มีค่าความหวาน 12-14°Brix เพื่อเพิ่มปริมาณของเหลว เป็นวิธีที่เรียกกันว่า “ การผ่าน้ำ” แล้วนำไปหมักต่อในที่เดิมอีกนานประมาณ 3 สัปดาห์ ถึง 1 เดือน

ขั้นตอนที่ 2 แอลกอฮอล์ในไวน์ข้าวจะถูกเปลี่ยนเป็นกรดน้ำส้มโดย **Acetobacter aceti** TISIR 102 ในถังหมักแบบเป่าอากาศขนาดบรรจุ 3 ลิตร ที่เรียกว่า“ Acetator” ในการทดลองใช้ acetator จำนวน 3 ถังในการศึกษาเกี่ยวกับผลของปัจจัยต่างๆ ได้แก่ ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์เริ่มต้น และการใช้สารเสริมการเจิญเติบโตของแบคทีเรียน้ำส้ม เช่น $NH_4H_2PO_4$ และ$K_4H_2PO_4$ในปริมาณต่างๆ ที่มีผลต่อกิจกรรมการผลิตกรดน้ำส้มของ **Acetobacter aceti** TISIR 102.

ผลการทดลองสรุปได้ว่าในขั้นตอนที่ 1 การหมักแอลกอฮอล์จากข้าวแต่ละชนิดให้ผลไม่ต่าง กันมากนัก กล่าวคือ ได้ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ อยู่ในช่วงร้อยละ 15-17 (v/v) เมื่อวัดด้วย Portable Refractometer RHW-25 ส่วนในขั้นตอนที่ 2 เมื่อใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 30 (v/v) ซึ่งจะทำให้มีความเข้มข้นของแอลกอฮอล์เริ่มต้นในน้ำหมักประมาณร้อยละ 13 (v/v) และเติม $NH_4H_2PO_4$ ลงไปในน้ำหมักด้วยในปริมาณ 10 กรัมต่อลิตรจะทำให้แบคทีเรียน้ำส้มสามารถผลิตกรด น้ำส้มได้ถึงร้อยละ 6 (w/v) ในระยะเวลาการหมัก 10 วัน สีของน้ำส้มสายชูที่หมักจากข้าวจ้าว และข้าวเหนียวขาวมีสีเหลืองทองเหมือนกัน แต่น้ำส้มสายชูที่หมักจากข้าวกล้องจะมีสีน้ำตาล

Name : Assitant Professor Nuntanit Kongwan

Project Title : Production of Fermented Vinegar from Thai Rice

Abstract

This research used broken rice and rice grain of polished rice, unpolished rice and white glutinous rice as the raw material for rice vinegar production. The process was devided into two steps. First step was alcohol fermentation (rice wine) from various type of rice by using Look-Pang and the second step was rice vinegar production (acetic acid) from rice wine which fermented from the first step by acetic acid bacteria **Acetobacter aceti** TISIR 102.

The first step: process were included steeping rice in water 5-10 minutes for broken rice and 6 hours for rice grain, excess water drained, steaming 30 minutes, cooling to room temperature, washing slime with water, excess water drained, mixed with Look-Pang powder in ratio 7 grams dry weight of Look-Pang powder to 1 kilogram of steamed rice, packed in 12 inch height and 9 inch diameter glass colume, covered with thin cloth, incubated in various condition; at room temperature, in cold room (10°C) and in the dark place at room temperature for 3 days, increased volume of liquid by adding with 12-14°Brix syrup, incubate at the same condition for 3 weeks to 1 month.

The second step: alcohol in rice wine was converted to acetic acid by **Acetobacter aceti** TISIR 102 in 3 litres capacity air bubble colume reactor call "acetator". Three acetators were used for the experiment studied about influence of various inoculum size, initial concentration of alcohol, and amount of growth supplement materil such as $NH_4H_2PO_4$ and $K_4H_2PO_4$ on acetic acid production activity of **Acetobacter aceti** TISIR 102.

The result was concluded that in first step there had no difference of alcohol concentration which fermented from each type of rice. The range of alcohol concentration was between 15-17% (v/v) when measured with Portable Refractometer RHW-25. In second step it was indicated that the inoculum size at 30% (v/v) which made the 13% (v/v) initial concentration of alcohol in mixture and 10g/L of $NH_4H_2PO_4$ added would reach 6% (w/v) of acetic acid produced in 10 days. The colour of polished rice vinegar was golden-yellowed similar to white glutinous rice vinegar but differ from unpolished rice vinegar which brown in coloured.

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ ..... ก
บทคัดย่อภาษาไทย ..... ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ค
สารบัญตาราง .....ง
สารบัญรูป .....จ
บทที่ 1 บทนำ
1.1 ความหมายและประเภทของน้ำส้มสายชู 1
1.2 คุณลักษณะที่ต้องการของน้ำส้มสายชู 1
1.3 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง ในขั้นตอนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากข้าว 3
1.3.1 ขั้นตอนที่ 1 การเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลโดยเชื้อรา
1.3.2 ขั้นตอนที่ 2 การเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์โดยยีสต์
1.3.2.1 การหมักโดยใช้ลูกแป้ง
1.3.2.2 การหมักโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์
1.3.3 ขั้นตอนที่ 3 การเปลี่ยนแอลกอฮอล์เป็นกรดน้ำส้มโดยเชื้อแบคทีเรียน้ำส้ม
1.4 ข้าว 13
1.4.1 โครงสร้างของเมล็ดข้าว
1.4.2 ชนิดของข้าว
1.4.3 การจำแนกชั้นทางวิทยาศาสตร์
1.4.4 ข้าวกล้อง ข้าวซ้อมมือ ข้าวขาว
1.5 กระบวนการหมักน้ำส้มสายชูจากข้าวโดยใช้ลูกแป้งและแบคทีเรียน้ำส้ม 17
1.5.1 การหมักแอลกอฮอล์จากข้าว (การหมักน้ำส่า หรือไวน์ข้าว)
1.5.1.1 การล้างและการแช่ข้าว
1.5.1.2 การนึ่งข้าว
1.5.1.3 การหมักแอลกอฮอล์
1.5.2 การผลิตกรดน้ำส้มจากน้ำส่า หรือไวน์ข้าว
1.6 กรรมวิธีการผลิตน้ำส้มสายชูหมัก 18
1.6.1 วิธีการหมักอย่างช้า (The Orleans process or slow process)
1.6.2 วิธีการหมักอย่างเร็ว (The Quick Vinegar process)
1.6.3 วิธีการหมักโดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่า “Acetator”

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

1.7 ปัจจัยที่ต้องการในการหมักน้ำส้มสายชู 19
1.7.1 ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์
1.7.2 ปริมาณออกซิเจน
1.7.3 ปริมาณกรดในน้ำหมัก
1.7.4 อุณหภูมิที่เหมาะสำหรับการหมัก
1.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 19
1.9 จุดประสงค์ของงานวิจัย 22
บทที่ 2 วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย 23
2.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี
2.1.1 วัตถุดิบ
2.1.2 เชื้อจุลินทรีย์
2.1.3 โหลแก้วสำหรับหมักแอลกอฮอล์ (น้ำส่า หรือไวน์ข้าว)
2.1.4 ถังหมัก และปั๊มเป่าอากาศสำหรับผลิตกรดน้ำส้ม
2.1.5 ชุดนึ่งข้าวไฟฟ้า
2.1.6 Portable Refractometer RHW-25 สำหรับใช้วัดความเข้มข้นของแอลกอฮอล์
2.1.7 สารเคมีที่ใช้ในการขยายหัวเชื้อ และใช้ในการเลี้ยงแบคทีเรียน้ำส้ม
2.1.8 สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณกรดน้ำส้ม
2.2 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย 27
2.2.1 กระบวนการหมักแอลกอฮอล์จากข้าวทั้งสามชนิดโดยใช้ลูกแป้งส่าเหล้า
2.2.2 การการผลิตกรดน้ำส้มโดยแบคทีเรียน้ำส้มจากน้ำส่า หรือไวน์ข้าวที่หมักได้จากข้าวทั้งสามชนิดในถังเป่าอากาศ
บทที่ 3 ผลการทดลอง 32
3.1 ขั้นตอนที่ 1 ผลของการหมักแอลกอฮอล์จากข้าว (การหมักน้ำส่า หรือไวน์ข้าว) โดยการใช้ลูกแป้งส่าเหล้า
3.1.1 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการแช่น้ำ และการนึ่งข้าว
3.1.2 สภาวะการหมักแอลกอฮอล์
3.2 ขั้นที่ 2 ผลของการผลิตกรดน้ำส้มจากแอลกอฮอล์ที่ผลิตได้จากขั้นตอนที่ 1 โดยใช้แบคทีเรียน้ำส้ม **Acetobacter aceti** TISTR 102
3.2.1 การศึกษาผลของการเติมสารเสริมการเจริญเติบโตประเภทเกลือ

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ฟอสเฟตลงในน้ำส่า ที่มีต่อการผลิตกรดน้ำส้มของแบคทีเรียน้ำส้ม

3.2.2 การศึกษาปริมาณเชื้อ(inoculum size) และปริมาณแอลกอฮอล์เริ่มต้นที่เหมาะสม

3.2.3 การศึกษาหาปริมาณที่เหมาะสมของสารเสริมการเจริญเติบโตของแบคทีเรียน้ำส้มในรูปของเกลือฟอสเฟตที่จะใช้เติมในน้ำส่า

3.3 การเก็บเกี่ยวและการเปรียบเทียบคุณลักษณะทางกายภาพของน้ำส้มสายชูที่หมักได้จากข้าวแต่ละชนิด

บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง 39

เอกสารอ้างอิง 40

ภาคผนวก 42

ข้อมูลนักวิจัย 45

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1.1 คุณสมบัติทางเคมีของน้ำส้มสายชูหมัก และน้ำส้มสายชูกลั่น.....2
ตารางที่ 1.2 เกณฑ์การกำหนดค่าสารปนเปื้อนในน้ำส้มสายชู 2
ตารางที่ 1.3 เปรียบเทียบคุณค่าทางโภชนาการของข้าวกล้อง และข้าวจ้าวชนิดขัดขาวก่อนหุง.....16-17
ตารางที่ 3.1 เปรียบเทียบปริมาณกรดน้ำส้มที่แบคทีเรียผลิต ระหว่างการใช้น้ำส่าที่ไม่เติมและน้ำส่าที่มีการเติมสารกระตุ้นการเจริญเติบโต $NH_4H_2PO_4$ และ KH_2PO_4 ที่ระยะเวลาการหมัก 7 วัน 33
ตารางที่ 3.2 ความสัมพันธ์ของ inoculum size กับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์เริ่มต้นการหมัก.....34
ตารางที่ 3.3 ปริมาณร้อยละของกรดน้ำส้มที่แบคทีเรียน้ำส้มผลิตขึ้นเมื่อใช้ inoculum size ร้อยละ 10 (v/v) ที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ 34
ตารางที่ 3.4 ปริมาณร้อยละของกรดน้ำส้มที่แบคทีเรียน้ำส้มผลิตขึ้นเมื่อใช้ inoculum size ร้อยละ 20 (v/v) ที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ 34
ตารางที่ 3.5 ปริมาณร้อยละของกรดน้ำส้มที่แบคทีเรียน้ำส้มผลิตขึ้นเมื่อใช้ inoculum size ร้อยละ 30 (v/v) ที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ 35
ตารางที่ 3.6 ปริมาณร้อยละของกรดน้ำส้มที่แบคทีเรียน้ำส้มผลิตขึ้นเมื่อใช้ inoculum size ร้อยละ 40 (v/v) ที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ 35
ตารางที่ 3.7 ปริมาณร้อยละของกรดน้ำส้มที่แบคทีเรียน้ำส้มผลิตขึ้นเมื่อใช้ inoculum size ร้อยละ 50 (v/v) ที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ 35
ตารางที่ 3.8 เปรียบเทียบปริมาณกรดน้ำส้มสูงสุดที่หมักได้ที่ระยะเวลาการหมัก 10 วัน เมื่อใช้ inoculum size ต่างๆ 36
ตารางที่ 3.9 ผลของสารเสริม $NH_4H_2PO_4$ ปริมาณต่างๆที่มีผลต่อการผลิตกรดน้ำส้มของแบคทีเรียน้ำส้ม เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดที่ระยะเวลาการหมัก 7 วัน 37

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1.1 ขั้นตอนการหมักน้ำส้มสายชูจากวัตถุดิบที่เป็นแป้งจากข้าว 3
รูปที่ 1.2 เชื้อ **Rhizopus sp.**.....4
รูปที่ 1.3 เชื้อ **Mucor sp.**.....4
รูปที่ 1.4 เชื้อรา **Aspergillus niger**.....5
รูปที่ 1.5 เชื้อรา **Aspergillus oryzae.** 5
รูปที่ 1.6 ลักษณะเซลยีสต์ที่กำลังแตกหน่อ 6
รูปที่ 1.7 ลักษณะของก้อนลูกแป้ง 7
รูปที่ 1.8 การปั้นและการตากแดดลูกแป้ง 9
รูปที่ 1.9 รูปร่างของแบคทีเรียน้ำส้ม 12
รูปที่ 1.10 โครงสร้างของเมล็ดข้าว 14
รูปที่ 1.11 สีของเมล็ดข้าวกล้อง 15
รูปที่ 1.12 เมล็ดข้าวสาร หรือข้าวขาว 16
รูปที่ 3.1 การลอยตัวของข้าวในระหว่างการหมักแอลกอฮอล์ 32
รูปที่ 3.2 เปรียบเทียบสีของน้ำส้มสายชูที่หมักได้จากข้าวจ้าว ข้าวกล้อง และข้าวเหนียว.....38

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความหมายและประเภทของน้ำส้มสายชู (มอก.83-2527 ข้อ 2 หน้า 1)

น้ำส้มสายชู (vinegar) หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นของเหลวใส ทำจากวัตถุดิบที่เหมาะสม ได้แก่ ธัญพืช ผลไม้ น้ำตาลหรือกากน้ำตาล ตามกรรมวิธีการผลิตน้ำส้มสายชูแต่ละประเภท มีรสเปรี้ยวที่เกิดจากกรดอะซีติก (acetic acid) เป็นส่วนใหญ่

น้ำส้มสายชูตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมนี้แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือน้ำส้มสายชูหมักและน้ำส้มสายชูกลั่น

1.1.1 น้ำส้มสายชูหมัก (fermented vinegaar) หมายถึง น้ำส้มสายชูที่ได้จากการนำวัตถุดิบมาหมักกับส่าเหล้า แล้วนำมาหมักกับเชื้อน้ำส้มสายชูตามกรรมวิธีการผลิต

1.1.2 น้ำส้มสายชูกลั่น (distilled vinegar or spirit vinegar)

distilled vinegar หมายถึง น้ำส้มสายชูที่ได้จากการกลั่นน้ำส้มสายชูหมัก

spirit vinegar หมายถึง น้ำส้มสายชูที่ได้จากการหมักเอทธานอลเจือจาง กับเชื้อน้ำส้มสายชูตามกรรมวิธีการผลิต แล้วนำไปกลั่นหรือกรอง

1.2 คุณลักษณะที่ต้องการของน้ำส้มสายชู (มอก. 83-2527 ข้อ 4 หน้า2-3)

1.2.1 ลักษณะทั่วไป

น้ำส้มสายชูหมัก ต้องมีลักษณะที่ต้องการดังนี้คือ

- มีสีตามธรรมชาติของวัตถุดิบที่ใช้ในกรรมวิธีการผลิต
- มีกลิ่นของกรดอะซีติค และอาจจะมีกลิ่นของวัตถุดิบที่ใช้หมักอยู่ด้วยก็ได้
- ใส ไม่มีหนอนน้ำส้ม สิ่งสกปรก หรือสิ่งเจือปนอื่นใด
- ไม่มีตะกอน นอกจากตะกอนที่เกิดโดยธรรมชาติของน้ำส้มสายชูหมัก

น้ำส้มสายชูกลั่น ต้องมีลักษณะที่ต้องการดังนี้คือ

- มีสีตามธรรมชาติของวัตถุดิบที่ใช้ในกรรมวิธีการผลิต
- มีกลิ่นของกรดอะซีติค และอาจจะมีกลิ่นของวัตถุดิบที่ใช้หมักอยู่ด้วยก็ได้
- ใส ไม่มีสิ่งสกปรก หรือสิ่งเจือปนอื่นใด
- ไม่มีตะกอน

1.2.2 คุณลักษณะทางเคมี

กำหนดให้มีเกณฑ์ต่างๆดังที่แสดงในตารางที่ 1.1

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ตารางที่ 1.1 คุณลักษณะทางเคมีของน้ำส้มสายชูหมัก และน้ำส้มสายชูกลั่น

รายการที่	คุณลักษณะ	เกณฑ์กำหนดสำหรับน้ำส้มสายชูหมัก	เกณฑ์กำหนดสำหรับน้ำส้มสายชูกลั่น	วิธีการวิเคราะห์
1	ปริมาณกรดอะซีติค (กรัมต่อ100 มิลลิลิตร) ต้องไม่น้อยกว่า	4	4	ภาคผนวก ก.
2	ของแข็งทั้งหมด(total solid) ร้อยละ	ไม่น้อยกว่า 1	ไม่มากกว่า 1	ภาคผนวก ข.
3	กรดแร่อิสระ (free mineral acid)	ต้องไม่พบ	ต้องไม่พบ	ภาคผนวก ค.

นอกจากนี้ยังมีการกำหนดถึงวัตถุเจือปนอาหาร และสารปนเปื้อนไว้โดยที่การแต่งสีให้ใช้ได้เฉพาะน้ำตาลเคี่ยวไหม้เท่านั้นซึ่งการตรวจวิเคราะห์ ใช้วิธีมาเทอร์ส (Mathers test)ในภาคผนวก ง. ให้ใช้วัตถุเจือปนอาหาร (Food Additives) ได้ดังนี้คือ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ไม่เกิน 70 มิลลิกรัม ต่อน้ำส้มสายชู 1 กิโลกรัม กรดแอล-แอสคอร์บิก ไม่เกิน 400 มิลลิกรัม ต่อน้ำส้มสายชู 1 กิโลกรัมส่วนสารปนเปื้อนนั้นมีเกณฑ์กำหนดดังแสดงในตารางที่ 1.2

ตารางที่ 1.2 เกณฑ์การกำหนดค่าสารปนเปื้อนในน้ำส้มสายชู

สารปนเปื้อน	ปริมาณสูงสุดที่ยอมรับให้มีได้ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม
สารหนู(As)	0.15
ตะกั่ว (Pb)	0.5
ทองแดง (Cu)	10
สังกะสี (Zn)	5

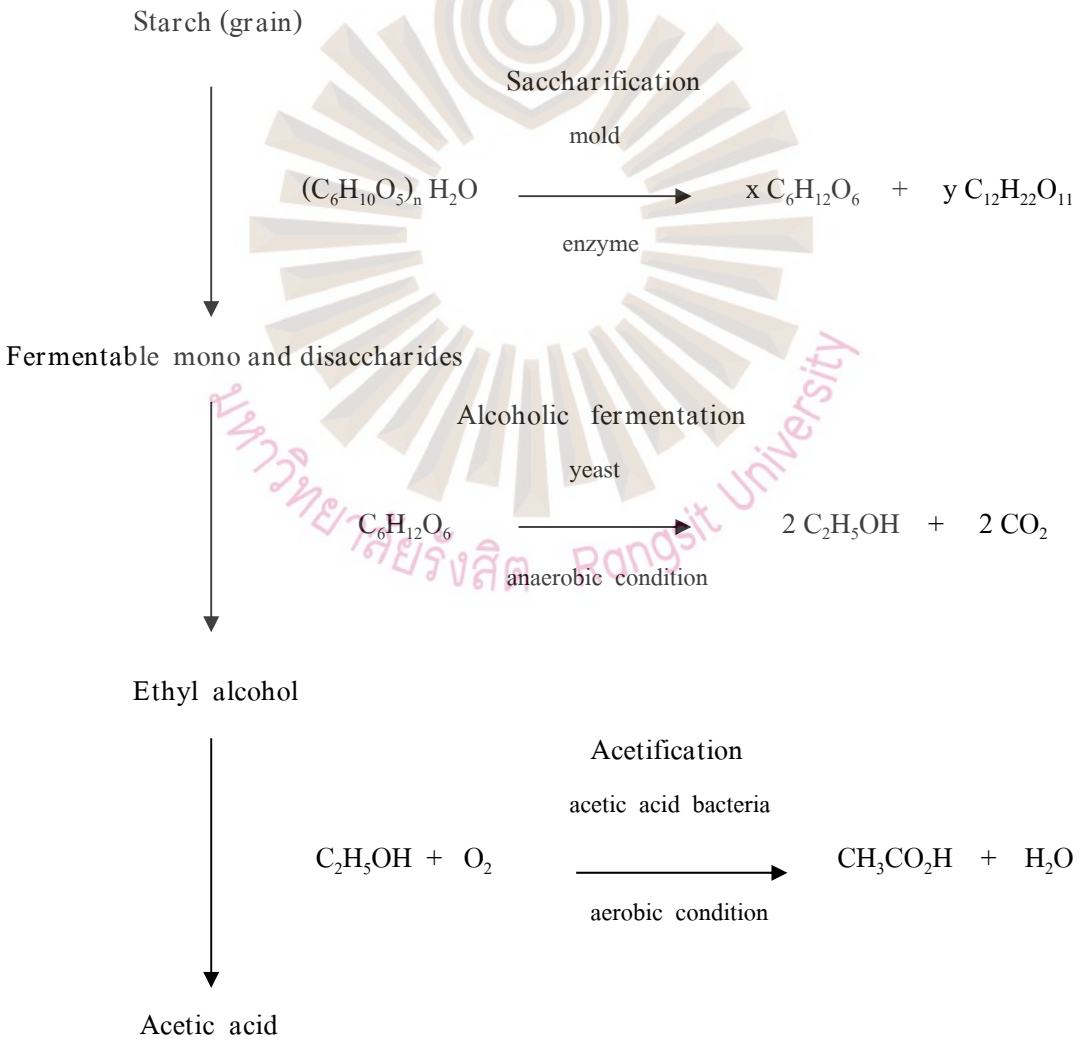
นอกจากนี้ต้องไม่มีกรดน้ำส้มชนิดที่มิได้ผลิตจากกระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมัก หรือน้ำส้ม สายชูกลั่น ไม่มีหนอนน้ำส้ม (vinegar eel) มีแอลกอฮอล์ตกค้างไม่เกิน ร้อยละ 0.5 และหากต้องทำการเจือจางความเข้มข้นของกรดน้ำส้มให้ใช้น้ำสะอาดเป็นส่วนผสม

สำหรับภาชนะที่ใช้ บรรจุต้องสะอาด ทำด้วยแก้วหรือเครื่องเคลือบดินเผามีฝาซึ่งปิดได้สนิทพอดีกับภาชนะบรรจุ วัตถุที่ใช้บุหรือใช้รองในฝาปิดหรือฝาชั้นในต้องไม่มีสี และไม่ทำปฏิกิริยากับ

น้ำส้มสายชู หรือละลายในน้ำส้มสายชู ปริมาตรสุทธิของน้ำส้มสายชูในแต่ละภาชนะบรรจุ ต้องไม่น้อยกว่าที่ระบุไว้ในฉลาก

1.3 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในขั้นตอนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากข้าว

จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องจะมี 2 กลุ่มใหญ่ดังนี้คือ กลุ่มแรกเป็นจุลินทรีย์ยูคาริโอต (eucaryote) ในกลุ่มฟังไจ (fungi) ซึ่งมี 2 ประเภทคือ รา และ ยีสต์ จุลินทรีย์เหล่านี้จะใช้สารอาหารจากวัตถุดิบซึ่งเป็นข้าวสำหรับการเจริญเติบโต และเพิ่มจำนวนเซลโดยปฏิกิริยาการหมัก ซึ่งเป็น Multiparallel fermentation หมายความถึงกระบวนการหมักที่มีหลายปฏิกิริยา และจะเกิดขึ้นพร้อมๆ กัน ซึ่งจะแบ่งออกเป็นสองขั้นตอนหลักตามสภาวะของการหมักและประเภทของจุลินทรีย์ คือขั้นตอนที่หนึ่งเป็นกระบวนการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาล และขั้นตอนที่สองการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ ส่วนจุลินทรีย์ กลุ่มที่สองเป็นแบคทีเรียสร้างน้ำส้มที่มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า **Acetobacier aceti** แบคทีเรียพวกนี้จะทำหน้าที่ในการเปลี่ยนแอลกอฮอล์ให้เป็นกรดน้ำส้ม ซึ่งในปฏิกิริยาในขั้นตอนนี้จะเกิดกาซคาร์บอนไดออกไซด์ขึ้นด้วยดังนี้



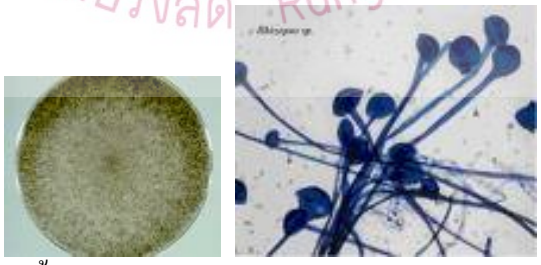
รูปที่ 1.1 ขั้นตอนการหมักน้ำส้มสายชูจากวัตถุดิบที่เป็นแป้งจากข้าว (Adam,1985)

1.3.1 ขั้นตอนที่ 1 การเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลโดยเชื้อรา (http//www. diw.go.th)

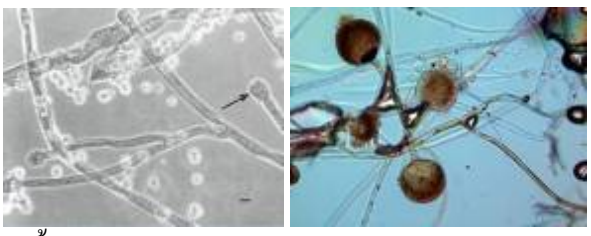
ในขั้นตอนนี้วัตถุดิบที่เป็นแป้งจะถูกเปลี่ยนให้เป็นน้ำตาลโดยใช้เอ็นไซม์จากเชื้อราเรียกว่าปฏิกิริยา “Saccharification” สภาวะนี้ต้องการอากาศสำหรับการเจริญของเชื้อรา เอ็นไซม์ที่สร้างโดยเชื้อราเป็นกลุ่มอะไมเลส(amylase) ประกอบด้วยแอลฟาอะไมเลส(alpha amylase) เบต้าอะไมเลส (beta amylase) และกลูโคอะไมเลส (glucoamylase) เอ็นไซม์เหล่านี้จะย่อยโครงสร้างแอลฟาฟอร์ม (α-form) ในโมเลกุลของเม็ดแป้งให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลใหญ่ น้ำตาลโมเลกุลคู่ และน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวตามลำดับ น้ำตาลพวกที่เป็น fermentable momo and disaccharides ได้แก่ กลูโคส (glucose) และมอลโทส (maltose) เชื้อรากลุ่มที่มีความสำคัญและมีบทบาทในการสร้างเอ็นไซม์ในปริมาณมาก ได้แก่ราในสอง Class ต่อไปนี้

- Class Zygomyces Order Mucorales Family Mucoraceae ได้แก่genus ที่สำคัญคือ
  Genus **Rhizopus sp.** (รูปที่1.2) เช่น **R .oryzae**, **R. japonicus**, **R. oligosporus**, **R arrhizus**
  Genus **Mucor sp.** (รูปที่ 1.3) เช่น **M. rouxii**, **M. fragilis**
  Genus **Amylomyces sp.** เช่น **Amylomyces rouxii**
- Class Deuteromycetes Order Moniliales Family Moniceae ได้แก่genus ที่สำคัญคือ
  Genus **Aspergillus sp.** เช่น **A. oryzae, A. niger** (รูปที่ 1.4-1.5)

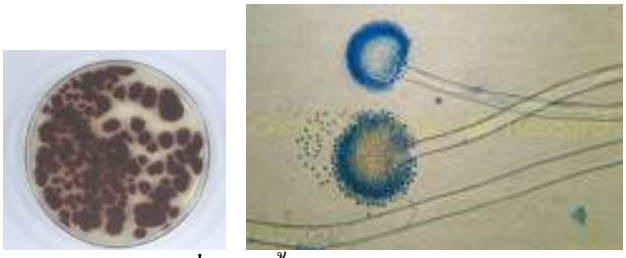
คุณสมบัติของเชื้อราในclassแรกคือ สามารถสร้างเอ็นไซม์ที่มีแอคทิวิตี้ (activity) สูงพร้อมกับสร้างกรดอินทรีย์ เช่น กรดฟูมาลิค(fumaric acid) กรดซิตริค(citric acid) และกรดแลคติค (lactic acid)ทำให้เกิดรสเปรี้ยว กรดที่เกิดขึ้นนี้จะเป็นตัวช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่เป็นสาเหตุของการปนเปื้อนได้ แต่การไฮโดรไลส์แป้งเกิดไม่สมบูรณ์ กล่าวคือให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (reducing sugar) น้อยกว่าclass หลัง ยกเว้นเชื้อรา **Amylomyces rouxii** ที่มีระดับการสร้างน้ำตาลรีดิวส์ได้สูงสุดในกลุ่ม เนื่องจากมีเอ็นไซม์ กลูโคอะไมเลส แต่ไม่ผลิตกรดจึงไม่ทำให้เกิดรสเปรี้ยว



รูปที่ 1.2 เชื้อรา **Rhizopus sp.**(http://www. moldtestingma.com)



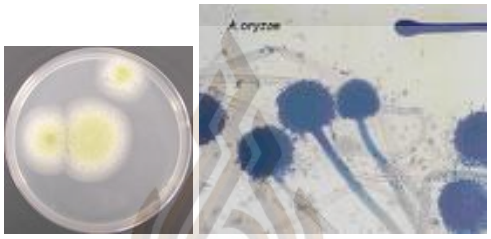
รูปที่ 1.3 เชื้อรา **Mucor sp..**(http://www. Trfenv.com/moldInfo.shtml.)



รูปที่ 1.4 เชื้อรา **Aspergillus niger**

(http://www.pollen.utuka.edu/spore/Aspergillus.html

และ http://www.ttuhsc.edu//Aspergillus niger.jdp.)

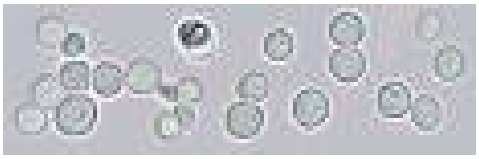


รูปที่ 1.5 **Aspergillus oryzae** (http://www.vschl.cz/kch/galerie/houby.htm)

ในการเจริญเติบโตเชื้อราจะสร้างเส้นใยจำนวนมากแผ่กระจายปกคลุมบริเวณผิวของเมล็ดข้าว และแทรกตัวอยู่ในบริเวณช่องว่างระหว่างเมล็ดข้าว มีบางส่วนที่แทงทะลุเข้าไปในเมล็ดข้าวด้วย เชื้อราจะสร้างเอ็นไซม์ จำนวนมากออกมาย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลเฟอร์เมนต์ (fermented sugar) ได้แก่ มอลโตไตรโอส (maltotriose) มอลโตส (maltose) กลูโคส (glucose) น้ำตาลนอนเฟอร์เมนต์ (non-fermented sugar) ได้แก่ ลิมิตเดกซ์ตริน (limit dextrin) และกรดอินทรีย์ นอกจากนี้ ยังได้สารอาหารและวิตามินบางตัวที่จะเป็นประโยชน์สำหรับการเจริญเติบโตของยีสต์ที่จะ มีบทบาทหน้าที่สำคัญในกระ บวนการเปลี่ยนน้ำตาลที่ถูกเชื้อราย่อยแล้ว ให้เป็นแอลกอฮอล์

1.3.2 ขั้นตอนที่ 2 การเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์โดยยีสต์ (http//www. diw.go.th)

สำหรับยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศ และไม่มีอากาศ (Facultative anaerobe) ในระยะแรกของกระบวนการผลิตที่มีการให้อากาศ ยีสต์จะยังไม่มีกิจกรรมเกี่ยวกับการหมัก แต่จะมีการใช้สารอาหารเพื่อเพิ่มจำนวนเซลอย่างรวดเร็ว ให้ได้ปริมาณที่มากพอ โดยวิธีการแตกหน่อ (budding)(รูปที่1.6) อีกทั้งยังมีสภาวะค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโต ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่ชอบเจริญในที่ที่เป็นกรด ซึ่งในขณะที่เชื้อราเจริญอยู่นั้นได้มีการผลิตกรดขึ้นมาในช่วงของการย่อยแป้ง ดังนั้นกรดที่เกิดขึ้นจึงมีประโยชน์ในการปรับสภาพให้เหมาะกับการเจริญของยีสต์ด้วย



รูปที่ 1.6 ลักษณะเซลยีสต์ที่กำลังแตกหน่อ

(http://www.darwin.baruch.cuny.edu./bio1003/fungihtm)

ต่อมาในกระบวนการผลิตมีการเติมน้ำลงไปทำให้เกิดเป็นสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน เชื้อราที่เจริญอยู่นั้นจะหยุดกิจกรรมเพราะเชื้อราเป็นจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศ (ออกซิเจน) ในการเจริญ (Stricty aerobe) ส่วยยีสต์ซึ่งเจริญได้ในทั้งสองสภาวะจะเปลี่ยนรูปแบบการสร้างพลังงานจากการหายใจที่ใช้ออกซิเจน (Aerobic respiration) มาเป็นกระบวนการหมัก หรือการหายใจแบบไม่ใช้ออกซิเจน (Alcoholic fermentation หรือAnaerobic respiration) ซึ่งในช่วงนี้จะเป็นขั้นตอนที่สองของกระ บวนการผลิต ที่เป็นการเปลี่ยนน้ำตาลรีดิวส์ให้เป็นแอลกอฮอล์

ยีสต์ที่ใช้ในการหมักแอลกอฮอล์ได้แก่ **Saccharomyces sp.** เช่น **S. cerevisiae, S. diastaticus, Hensenula sp.** และยีสต์ใน Class Blastomycetes Family Cryptococcaceae ได้แก่ Genus **Torulopsis sp.** ซึ่งโดยทั่วไปมีคุณสมบัติคล้ายกับ **S. cerevisiae** กล่าวคือมีการเจริญเติบโตเร็ว ทนต่อความเป็นกรด ทนต่อความเข้มข้นของน้ำตาล และทนต่อระดับแอลกอฮอล์ได้ดี มียีสต์บางชนิดที่สามารถเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลเฟอร์เมนต์ได้ เนื่องจากมีเอนไซม์กลูโคอะไมเลสคือยีสต์ในกลุ่ม Ascomycetous ซึ่งอยู่ใน Class Ascomycetes

Subclass Hemiascomycetidae

Order Endomycetales

Family Saccharomyceideae

ได้แก่ Genus **Endomycopsis sp.** เช่น **E. fibuligera**

เมื่อต้องการให้ยีสต์เปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์จะต้องปรับสภาพให้อยู่ในสภาวะไร้อากาศ ปัจจัยที่มีผลต่อการหมักได้แก่ อัตราส่วนของปริมาณระหว่างข้าว ต่อเชื้อราและยีสต์ ช่วงระยะเวลาที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตเพิ่มปริมาณเซลของยีสต์ (Lag-phase) ที่อุณหภูมิการหมักนั้นๆ องค์ประกอบของสารอาหาร ปริมาณกรดอินทรีย์ ปริมาณออกซิเจน ความสามารถในการทนต่อสภาวะแวดล้อมของยีสต์ เช่น ระดับแอลกอฮอล์ ความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ และอุณหภูมิที่สูงขึ้นขณะที่เซลมีกิจกรรมจุลินทรีย์ที่นำใช้ในกระบวนการผลิตแอลกอฮอล์แบ่งเป็นสองแบบคือ การใช้ในลักษณะลูกแป้ง และการใช้เชื้อบริสุทธิ์ซึ่งจะกล่าวในรายละเอียดต่อไปนี้

1.3.2.1 การหมักโดยใช้ลูกแป้ง

ลูกแป้งตามพระราชบัญญัติ พ.ศ. 2493 มาตรา 4 จัดเป็นเชื้อสุราอย่างหนึ่งตามนิยามดังนี้ “เชื้อสุรา”

หมายถึง แป้งเชื้อสุรา แป้งข้าวหมัก หรือเชื้อใดๆก็ตามที่เมื่อนำมาหมักกับวัตถุหรือของเหลวแล้วสามารถทำให้เกิดแอลกอฮอล์ที่ใช้ทำสุราได้

รูปที่ 1.7 ลักษณะของก้อนลูกแป้ง(http://www.surathai.net)

ลูกแป้งที่ทำกันอยู่จากอดีตถึงปัจจุบันแบ่งออกได้เป็น 3 แบบดังนี้

แบบที่ 1 ลูกแป้งสำหรับย่อยแป้งเป็นน้ำตาลอย่างเดียว

ลูกแป้งชนิดนี้จะมีเชื้อราเป็นตัวย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล ใช้สำหรับทำข้าวหวาน หรือข้าวหมาก หรือข้าวแช่

แบบที่ 2 ลูกแป้งสำหรับย่อยน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์

ลูกแป้งชนิดนี้จะมียีสต์เป็นตัวย่อยน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์และคาร์บอนไดออกไซด์ ใช้สำหรับหมักน้ำหวานให้เป็นเหล้า เช่น ใช้ในการหมักน้ำตาลให้กลายเป็นน้ำตาลเมา หรือกระแช่

แบบที่ 3 ลูกแป้งที่ย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลและย่อยน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์

เป็นลูกแป้งที่มีเชื้อราและยีสต์ผสมกันอยู่ในอัตราส่วนที่พอเหมาะ เรียกว่าแป้งเหล้าโท ในลูกแป้งชนิดนี้เชื้อรามีหน้าที่ในการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล จากนั้นยีสต์จะย่อยน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์และคาร์บอนไดออกไซด์ คุณภาพของแป้งเหล้าขึ้นอยู่กับอัตราส่วนระหว่างรา และยีสต์ต้องพอเหมาะกัน ถ้าในลูกแป้งมียีสต์มากเกินไป ราจะย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลไม่ทัน เมื่อยีสต์ใช้น้ำตาลได้เร็วจะผลิตกาซคาร์บอนไดออกไซด์ในปริมาณมาก ออกซิเจนน้อยลงจะมีผลทำให้เชื้อราไม่เจริญเติบโตดังนั้นในกระบวนการผลิตจึงเกิดแอลกอฮอล์ในปริมาณต่ำ และเนื่องจากความยากในการควบคุมอัตราส่วนที่พอเหมาะระหว่างเชื้อราและยีสต์นี้เองทำให้ผู้ผลิตส่วนใหญ่นิยมที่จะใช้ลูกแป้งแบบที่ 1 และแบบที่ 2 ในการผลิตในระดับอุตสาหกรรมมากว่าการใช้ลูกแป้งแบบที่ 3

ตัวอย่างสูตรการทำลูกแป้งจากเชื้อบริสุทธิ์(http://www.isan.clubs.ac.th)

- เครื่องเทศ 30 กรัม
- ข่า 300 กรัม
- กระเทียม 100 กรัม
- แป้งข้าวเหนียว 850 กรัม
- ยีสต์ 100 มิลลิลิตร
- เชื้อรา 100 มิลลิลิตร
- น้ำสะอาดปลอดเชื้อ 250 มิลลิลิตร

การเตรียมเครื่องเทศให้นำส่วนประกอบต่างๆบดให้ละเอียดแล้วนำมาผสมกันในอัตราส่วนดังนี้

- ดอกจันทร์ 15 กรัม
- เปราะหอม 15 กรัม
- กานพลู 15 กรัม
- โกฐพุงปลา 15 กรัม
- พริกไทยขาว 50 กรัม
- พริกไทยดำ 75 กรัม
- ขิงแห้ง 25 กรัม
- ดีปลี 50 กรัม
- ลูกจันทร์เปลือก 40 กรัม
- แปดกลีบ 15 กรัม
- ชะเอมไทย 130 กรัม
- อบเชย 100 กรัม
- จะด่าน 100 กรัม
- รากไคร้เครือ 100 กรัม
- เจตมูลเพลิงแดง 30 กรัม
- โกฐสอ 50 กรัม
- โกฐจุฬาสัมพา 25 กรัม
- มะตูมแห้ง 75 กรัม

วิธีทำ

บดข่า กระเทียม ขิง ให้ละเอียด นำไปผสมกับเครื่องเทศที่เตรียมไว้ คลุกเคล้าให้เข้ากันกับแป้งข้าวเหนียว เทเชื้อราและยีสต์ลงไป เติมน้ำสะอาดทีละน้อยจนสามารถปั้นแป้งเป็นก้อนได้ วางเรียงบนภาชนะโปร่ง คลุมทับด้วยผ้าขาวบางสองชั้น นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง หรือบ่มในบรรยา กาศที่มีการควบคุมระดับความชื้นสัมพัทธ์และอุณหภูมิจนเชื้อราเจริญ สังเกตจากลักษณะของลูกแป้งที่มีเส้นใยสีขาวขึ้นฟู แล้วจึงนำไปตากแดดให้แห้ง (รูปที่ 1.8) ลูกแป้งที่แห้งแล้วจะมีน้ำหนักเบา วัดค่าความชื้นสุดท้ายได้น้อยกว่าร้อยละ 20 นำไปเก็บไว้ในภาชนะที่ปิดสนิท

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

รูปที่ 1.8 การปั้น และตากแดดลูกแป้ง

(http://www.sainan.sawanbanna.net และ http://www. isan.clubs.ac.th)

ตัวอย่างสูตรการทำลูกแป้งต่อเชื้อจากลูกแป้งเก่า

- แป้งข้าวจ้าว หรือแป้งข้าวเหนียว 400 กรัม
- กระเทียม 6 กรัม
- ขิง และ ข่า อย่างละ 6 กรัม
- ชะเอม 6 กรัม
- พริกไทย 6 กรัม
- ดีปลี 2 กรัม
- ลูกแป้งเก่า 5 กรัม ต่อ แป้ง 1 กิโลกรัม

วิธีทำ

บดสมุนไพรเครื่องเทศให้ละเอียดผสมกับแป้งข้าวจ้าว หรือแป้งข้าวเหนียวค่อยๆเติมน้ำสะอาดปลอดเชื้อ จนสามารถปั้นเป็นก้อนได้ เรียงลูกแป้งบนภาชนะก้นโปร่ง บดลูกแป้งเก่าให้ละเอียด นำไปโรยลงบนลูกแป้งที่ปั้นไว้ นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องนานประมาณ 48 ชั่วโมง หรือจนกว่าจะมีเส้นใยสีขาวๆ เหลืองๆขึ้นจับที่ผิวของก้อนแป้งแสดงว่าเชื้อรา และยีสต์มีการเจริญเติบโตแล้ว จากนั้นนำไปตากแดดเพื่อหยุดการเจริญของเชื้อ เมื่อแห้งแล้วนำไปเก็บในภาชนะที่ปิดสนิท

คุณสมบัติที่ดีเป็นที่ต้องการของเชื้อจุลินทรีย์ในลูกแป้ง

เชื้อรา

- มีความสามารถในการสร้างเส้นใยในปริมาณมากในระยะเวลารวดเร็ว
- มีความสามารถในการสร้าง fermentable sugar
- ให้กลิ่นที่ดี

ยีสต์

- สร้างแอลกอฮอล์ได้ในปริมาณสูง
- ทนต่อสภาวะแวดล้อมที่มีความเข้มข้นของแอลกอฮอล์สูง
- หมักได้ดีที่อุณหภูมิห้อง
- ไม่ให้กลิ่นกาซไข่เน่า และ เมื่อสิ้นสุดการหมักต้องสามารถตกตะกอนได้ดี ลูกแป้งที่ดีต้องประกอบไปด้วยเชื้อราและยีสต์สายพันธุ์ที่ต้องการ โดยไม่มีจุลินทรีย์ชนิดปนเปื้อนหรือมีน้อยชนิดที่สุด

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ถ้ามีการปนเปื้อนในปริมาณสูงจะทำให้การหมักได้แอลกอฮอล์ในปริมาณต่ำ น้ำหมักที่ได้มีคุณภาพไม่ดี เช่น ขุ่น เกิดสี มียางเหนียว มีกลิ่นบูด นอกจากนี้ในระหว่างการหมักจะมีการสร้างกาซคาร์บอนไดออกไซด์ และกาซไฮโดรเจนในปริมาณมาก มีการสร้างเอนไซม์ที่จะไปทำปฏิกิริยาการเปลี่ยนกรดอะมิโน (amino acid) ไปเป็นฟูเซลออยส์ (fusel oil) มีการสร้างและสะสมเอทิลคาร์บาเมต (ethyl carbamate) เกิดการออกซิไดซ์กรดอินทรีย์ (organic acid) และแอลกอฮอล์

เครื่องเทศสมุนไพรที่เป็นส่วนผสมในลูกแป้งอาจจะใช้ในลักษณะเป็นผง หรือเป็นสารสกัดในน้ำเดือดก็ได้ ชนิดและปริมาณที่ใช้ถือว่าเป็นความลับของแต่ละสูตร เครื่องเทศสมุนไพรเหล่านี้ทำหน้าที่เป็นทั้งสารส่งเสริมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่ต้องการ และเป็นสารยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อน เช่นการใช้ อบเชย เป็นแหล่งของคาร์บอน ไนโตรเจน วิตามิน และเกลือแร่ สำหรับช่วยเสริมการเจริญเติบโต และกิจกรรมการหมักของเชื้อรา และยีสต์ การใช้กานพลูเป็นสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดปนเปื้อน เป็นต้น ในลูกแป้งจะไม่มีการใช้เครื่องเทศสมุนไพรอย่างเดียว หรืออย่างใดอย่างหนึ่งในปริมาณมาก แต่จะใช้หลายชนิดเพื่อเสริมฤทธิ์ซึ่งกันและกัน (Synergistic effect) ดังนั้นจึงไม่ควรเก็บลูกแป้งไว้นานก่อนการนำมาใช้ เนื่องจากเมื่อเครื่องเทศสมุนไพรเหล่านี้เกิดการระเหยจะทำให้คุณสมบัติต่างๆเสียไป เกิดการปนเปื้อนมากขึ้น ลูกแป้งจึงด้อยคุณภาพลงเรื่อยๆตามอายุการเก็บ เมื่อนำลูกแป้งมาทำการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์จะพบว่ามีหลายสายพันธุ์ทั้งสายพันธุ์ที่ต้องการ และไม่ต้องการดังนี้

เชื้อรา

เชื้อราที่ใช้ใน Amylo process ได้แก่ **Mucor rouxii , Rhizopus japonicus, R. tonkinensis** ชนิดที่นิยมใช้กันมากคือ **R. delema** ซึ่งมีประสิทธิภาพในการ saccharify ได้ดีมาก และสร้างกรดน้อย นอกจากนั้นยังพบเชื้อราในสกุลอื่นด้วย เช่น **Clamydomucor sp., Aspergillus sp., Penicillium sp.** และ **Monella sp.**

ยีสต์

ยีสต์ที่พบในลูกแป้งมีสองกลุ่มใหญ่คือ ยีสต์หมักแป้ง และยีสต์ไม่หมักแป้ง

- ยีสต์หมักแป้ง

จัดอยู่ในกลุ่ม filamentous type ได้แก่ **Saccharomycopsis sp., Endomycopsis sp.**

- ยีสต์ไม่หมักแป้ง

ยีสต์พวกนี้อยู่ใน Family Saccharomycetaceae ได้แก่ **Saccharomyces cerevisiae, S.diastaticus, Pichia sp.**และ **Hansenula sp.**

Family Cryptococcaceae ได้แก่ **Candida sp., Toruropsis sp.,Kloeckera sp., Rhodotorular sp.** และ **Trichosporon sp.**

Family Sporobolemycetaceae ได้แก่ **Sporobolemyces sp.**

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ลักษณะทางกายภาพที่ดีของลูกแป้ง

- มีน้ำหนักเบา เนื้อฟูมีโพรงอากาศข้างใน แสดงว่ายีสต์มีกิจกรรมในการสร้างกาซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ดี
- มีกลิ่นเครื่องเทศ ไม่เหม็นเปรี้ยวจากการปนเปื้อนของแบคทีเรียน้ำส้ม
- มีสีขาวนวลเป็นสีเดียวกันทั้งลูก ไม่มีสีดำ หรือสีเขียวของเชื้ออื่นปะปน
- เมื่อบี้ดูจะเห็นเส้นใยของเชื้อรากระจายตัวดีเกาะกับผงแป้ง
- เมื่อชิมดูจะมีรสหวาน แสดงถึงประสิทธิภาพในการสร้างน้ำตาลของเชื้อรา

คุณสมบัติที่ดีของลูกแป้งเมื่อทดสอบการหมักกับข้าวเหนียว

- หมักให้น้ำต้อย (น้ำเชื่อมขาว) ปริมาณมากในเวลาสั้น
- หมักได้แอลกอฮอล์ในปริมาณสูง
- หมักแล้วได้กลิ่นหอม
- สภาวะการหมักควรมีการปนเปื้อนน้อย หรือเกิดการปนเปื้อนได้ยาก

1.3.2.2 การหมักโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์

กระบวนการหมักเริ่มจากการขยายปริมาณเชื้อบริสุทธิ์สายพันธุ์ที่คัดเลือกแล้วโดยการถ่ายสปอร์ (spore)หรือเส้นใยของเชื้อราลงบนข้าวนึ่ง บ่มที่อุณหภูมิห้องจนเชื้อราเจริญเติบโตจนปรากฏเส้นใยจำนวนมากปกคลุมบนเมล็ดข้าว ซึ่งใช้เวลานานประมาณ 5-6 วัน ขั้นตอนนี้เรียกว่าการเตรียมโคจิ(Koji) หลังจากนั้นทำการขยายขนาดโคจิ โดยเตรียมข้าวนึ่งตามปริมาณที่ต้องการ ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วถ่ายโคจิที่เตรียมไว้ (starter) ลงบนข้าวนึ่ง คลุกเคล้าให้เข้ากัน บ่มทิ้งไว้นาน 2 วัน ในระยะการบ่ม นี้ควรมีการคลุกเคล้าบ้างเป็นระยะเมื่อสิ้นสุดการบ่มอุณหภูมิในกองข้าวจะสูงประมาณ 42 องศาเซลเซียสและมีเส้นใยสีขาวปกคลุมอยู่เต็ม บางส่วนเส้นใยจะแทงทะลุเข้าไปในเมล็ดข้าว ในโคจินี้จะมีเอ็นไซม์(enzyme) กรดอินทรีย์ (organic acid) วิตามิน (vitamin) และสารอาหารต่างๆที่เป็นประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ที่ทำหน้าที่ต่อไปในช่วงของการหมักแอลกอฮอล์ โดยการถ่ายเชื้อยีสต์บริสุทธิ์สายพันธุ์ที่ต้องการลงไป เชื้อยีสต์ที่ใช้ควรมีจำนวนเซลเริ่มต้น 10^8 เซล/มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้นาน 3 วัน ในระยะนี้ให้มีการกวนผสมเป็นระยะๆ ในช่วงนี้ยีสต์จะเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนเซลมากขึ้นและเป็นระยะเริ่มต้นของการหมักแอลกอฮอล์ จากนั้นจึงทำการขยายการหมักเป็นระดับใหญ่ต่อไป

1.3.3 ขั้นตอนที่ 3 การเปลี่ยนแอลกอฮอล์เป็นกรดน้ำส้มโดยเชื้อแบคทีเรียน้ำส้ม

การเปลี่ยนแอลกอฮอล์ให้เป็นกรดน้ำส้ม (กรดอะซีติค: acetic acid)โดยการใช้แบคทีเรียน้ำส้มซึ่งเป็นแบคทีเรียพวก **Acetobacter aceti** ต้องทำการหมักในสภาพที่มีอากาศ ปฏิกิริยาออกซิเด ชั่นเกิดขึ้นสามขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนแรกเป็นการเปลี่ยนแอลกอฮอล์เป็นอะเซทัลดีไฮด์ (acetaldehyde)โดยใช้เอนไซม์แอลกอฮอล์ ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

ขั้นตอนที่สองเป็นการเปลี่ยนอะเซทัลดีไฮด์ให้เป็นไฮเดรตอะเซทัลดีไฮด์ (hydrate acetaldehyde) โดยใช้เอนไซม์อะเซทัลดีไฮด์ ดีไฮโดรจีเนส (acetaldehyde dehydrogenase) เป็นตัว เร่งปฏิกิริยา

ขั้นตอนที่สามเป็นการสร้างกรดน้ำส้ม จากไฮเดรตอะเซทัลดีไฮด์ จากปฏิกิริยาโดยรวมทั้งสามขั้นตอนสามารถสรุปเป็นสมการแสดงปฏิกิริยาการเปลี่ยนแอลกอฮอล์เป็นกรดอะซีติคได้ดัง นี้

$$C_2H_5OH + O_2 \rightarrow CH_3CO_2H + H_2O$$

alcohol — acetic acid

จุลินทรีย์แบคทีเรียน้ำส้ม (**Acetic acid bacteria**) (http://en-wikipedia.org/wiki/Acetic acid bacteria)

Scientific classification :

Kingdom	Bacteria
Phylum	Proteobacteria
Class	Alpha Proteobacteria
Order	Rhodospirillales
Family	Acetobacteraceae
Genera	Acetobacter

รูปที่ 1.9 รูปร่างของแบคทีเรียน้ำส้ม (http//www. vinegarman.com)

แบคทีเรียน้ำส้มมีรูปร่างเป็นแท่ง (rod-shaped) แกรมลบ (gram -negative) ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต (aerobic) ได้พลังงานจากการออกซิไดซ์ (oxidized) เอทธานอล เป็นกรดน้ำส้ม เป็นแบคทีเรียที่สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติบริเวณที่มีเอทธานอลที่ถูกยีสต์หมักจากน้ำตาล โดยทั่วไปแหล่งที่จะคัดแยกเชื้อพวกนี้ออกมาได้ เช่นในไวน์ หรือเบียร์ที่ผ่านการกรองที่ไม่ปลอดเชื้อ แบคทีเรียน้ำส้มบางสกุลมีความสามารถในการออกซิไดซ์กรดน้ำส้มให้เป็นกาซคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ ซึ่งจะทำให้ความเข้มข้นของกรดน้ำส้มในสารละลายลดลง

1.4 ข้าว

ข้าวเป็นพืชตระกูลหญ้าที่สามารถกินเมล็ดได้ เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ต้นข้าวมีลักษณะบางอย่าง เช่น ใบ กาบใบ ลำต้น และรากคล้ายต้นหญ้า

1.4.1 โครงสร้างของเมล็ดข้าว (รูปที่ 1.10) (http//www.ricethailand.org)

เมล็ดข้าว(rice fruit, rice grain, rice seed) เป็นผลชนิด caryopsis เนื่องจากส่วนที่เป็นเมล็ดเดี่ยว (single seed) ติดแน่นอยู่กับผนังของรังไข่ หรือเยื่อหุ้มผล (pericarp)

เมล็ดข้าวประกอบด้วยส่วนใหญ่ๆ สองส่วนคือ

- ส่วนที่ห่อหุ้มเรียกว่าแกลบ (hull หรือ husk)
- ส่วนที่รับประทานได้เรียกว่า ข้าวกล้อง (caryopsis หรือ brown rice)

แกลบ ประกอบด้วย เปลือกใหญ่ (lemma) เปลือกเล็ก (palea) หาง (awn) ขั้วเมล็ด (rachilla) และกลีบรองเมล็ด (Sterile lemmas)

ข้าวกล้อง หรือส่วนของเมล็ดข้าวที่เอาเปลือกออกแล้ว ประกอบด้วยส่วนต่างๆดังนี้

- เยื่อหุ้มผล (pericarp) หรือ fruit coat ประกอบด้วยเนื้อเยื่อสามชั้นคือ epicarp, mesocarp และ endocarp เยื่อหุ้มผลมีลักษณะเป็น fibrous ผนังเซลประกอบด้วย โปรตีน (protein) เซลลูโลส (cellulose) และ เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose)

- เยื่อหุ้มเมล็ด (tegmen หรือ seed coat) อยู่ถัดจากเยื่อหุ้มเมล็ดเข้าไป ประกอบด้วยเนื้อเยื่อสองชั้นเรียงกันเป็นแถวเป็นที่อยู่ของสารประเภทไขมัน (fatty acid)

- เยื่ออาลูโรน (aleurone) อยู่ถัดจาก tegmen ทำหน้าที่ห่อหุ้มส่วนที่เป็นข้าวสาร (starchy endosperm) และคัพภะ (embryo) เยื่ออะลูโลนมีองค์ประกอบเป็นโปรตีนในปริมาณสูง นอกจากนั้นเป็นน้ำมัน(oil) เซลลูโลส (cellulose) และ เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose)

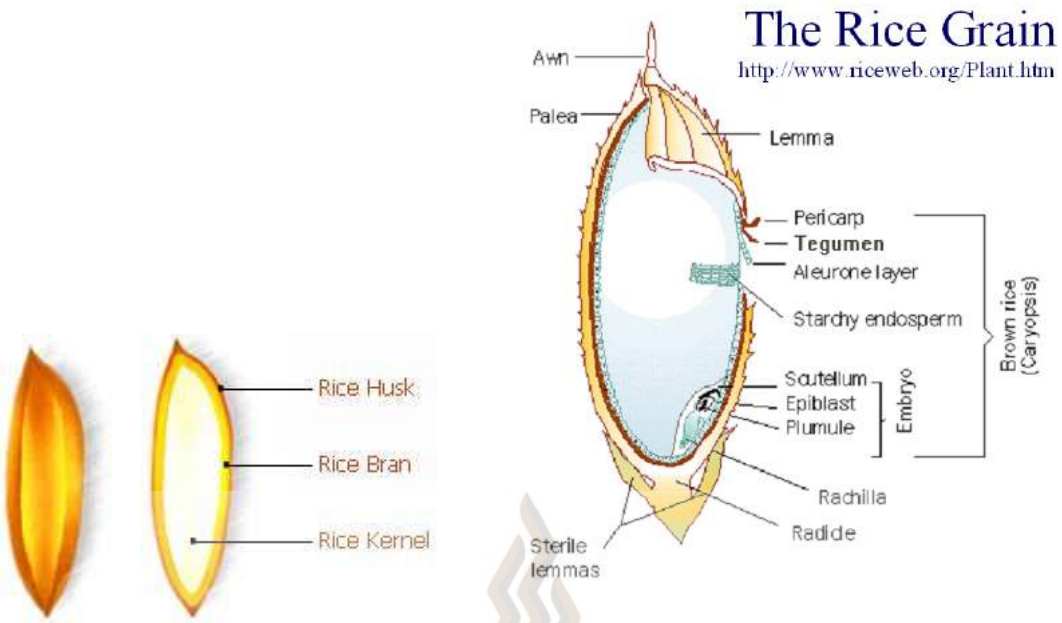
- ส่วนที่เป็นแป้ง (starchy endosperm) เป็นส่วนที่เรียกว่าข้าวสาร อยู่ชั้นในสุดของเมล็ด ประกอบด้วยแป้งเป็นส่วนใหญ่ และมีโปรตีนอยู่บ้าง แป้งในเมล็ดข้าวมีสองชนิด คืออะมิโลเพคติน (amylopectin) และ อะมิเลส (amylase)

อะมิโลเพคติน เป็นโพลิเมอร์ (polymer) ของ D- glucose ที่ต่อกันเป็น branch chain

อะมิโลส เป็นโพลิเมอร์ของD-glucose ที่ต่อกันเป็น linear chain

ส่วนประกอบของแป้งทั้งสองชนิดมีสัดส่วนที่ต่างกันออกไปตามชนิดของข้าว ข้าวเหนียวจะมีอะมิโลเพคตินมากกว่าในขณะที่ข้าวจ้าวจะมีอะมิโลสมากกว่า

- คัพภะ (embryo) อยู่ติดกับ endosperm ทางด้านเปลือกใหญ่ คัพภะเป็นส่วนที่จะเจริญเป็นต้นต่อไป ประกอบด้วย ต้นอ่อน (plumule) รากอ่อน (radicle) เยื่อหุ้มต้นอ่อน (coleoptile) เยื่อหุ้มรากอ่อน (coleorhiza) ท่อน้ำท่ออาหาร (epiblast)และใบเลี้ยง (scutellum) คัพภะเป็นส่วนที่มีองค์ประกอบที่มีโปรตีนและไขมันสูง



รูปที่ 1.10 โครงสร้างของเมล็ดข้าว (http://www.riceweb.org/plant.html)

1.4.2 ชนิดของข้าว (http//www. kanchanapisek.or.th)

ข้าวที่ปลูกเพื่อใช้ในการบริโภคสามารถแบ่งออกได้เป็นชนิดต่างๆ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสิ่งที่ใช้เป็นมาตรการในการแบ่งดังนี้

1.4.2.1 การแบ่งตามสภาพพื้นที่ปลูก แบ่งได้เป็น

- ข้าวไร่ หมายถึงข้าวที่ปลูกบนที่ดอน ไม่มีน้ำขังในพื้นที่ปลูก
- ข้าวนาสวน หมายถึงข้าวที่ปลูกแบบปักดำหรือหว่าน ระดับน้ำในนาลึกไม่เกิน 80 เซนติเมตร
- ข้าวนาเมือง หรือข้าวขึ้นน้ำ หมายถึง ข้าวที่ปลูกแบบหว่าน ระดับน้ำในนาลึกมากกว่า80 เซนติเมตรขึ้นไป

1.4.2.2 แบ่งตามชนิดของแป้งในเมล็ดที่บริโภค แบ่งได้เป็น

- ข้าวจ้าว ประกอบด้วยอะมิโลส ประมาณร้อยละ 30
- ข้าวเหนียว ประกอบด้วยอะมิโลเพคตินเป็นส่วนใหญ่ และมีอะมิโลสน้อยมาก อะมิโล เพคตินทำให้เมล็ดข้าวมีความเหนียวเมื่อหุงต้มสุกแล้ว

1.4.3 การจำแนกชั้นทางวิทยาศาสตร์ (http//www. kanchanapisek.or.th)

อาณาจักร: Plantae

ส่วน : Magnoliophyta

ชั้น: Liliopsida

ตระกูล: Poales

วงศ์: Poaceae

สกุล: **Oryza**

ข้าวที่นิยมบริโภคมีอยู่สองสปีชีส์ (species) ใหญ่ๆ คือ

- **Oryza glaberrima** มีปลูกเฉพาะเขตในแอฟริกาเท่านั้น
- **Oryza sativa** มีปลูกทั่วไปในทุกประเทศ

ข้าวชนิด **Oryza sativa** ยังแบ่งออกได้เป็น **indica** ที่ปลูกกันมากในเขตร้อน และ **japonica** ที่ปลูกมากในเขตอบอุ่น ข้าวที่ปลูกในประเทศไทยเป็น **indica** ซึ่งแบ่งออกเป็นข้าวจ้าว และข้าวเหนียว ต่อมามีการคัดเลือกปรับปรุงสายพันธุ์กันอย่างแพร่หลาย ทำให้ในปัจจุบันมีข้าวให้บริโภคกันหลากหลายสายพันธุ์ โดยข้าวแต่ละสายพันธุ์จะมีรสชาติ และประโยชน์การใช้สอยที่ต่างกันออกไป

ปกติชาวนาจะปลูกข้าวกันในฤดูฝนใช้น้ำฝนในการปลูกข้าวเรียกว่า “นาปี” แต่ในบางท้องที่มีน้ำชลประทานซึ่งได้จากเขื่อนต่างๆ ชาวนาจะปลูกข้าวนอกฤดูฝนด้วย เรียกว่า “นาปรัง” ข้าวที่ปลูก บนที่ดอนหรือภูเขาซึ่งเป็นที่ที่ไม่มีน้ำขังในพื้นที่ปลูก เรียกว่า “ข้าวไร่”

1.4.4 ข้าวกล้อง ข้าวซ้อมมือ ข้าวขาว

ข้าวเป็นอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรท โดยเฉลี่ยข้าวสารจะมีแป้งประมาณร้อยละ 70-80 และโปรตีน ร้อยละ 5-8

ข้าวกล้อง (Cargo rice, Loonzain rice, Brown rice, Husked rice, unpolished rice)

รูปที่ 1.11 สีของ เมล็ดข้าวกล้อง(http//www. doa.go.th)

ชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ **Olyza sativa Linn.** คือข้าวที่สีเอาแต่เปลือกหรือแกลบออกไปโดยยังมีจมูกข้าวและเยื่อหุ้มเมล็ดอยู่ ส่วนที่เป็นจมูกข้าวและเยื่อหุ้มเมล็ดข้าวนี้มีวิตามินและเกลือแร่ที่มีคุณค่าทางอาหารและเป็นประโยชน์มากมายดังนี้

วิตามินบี 1(Vitamin B_1)	ป้องกันโรคเหน็บชา
วิตามินบี 2 (Vitamin B_2)	ป้องกันโรคปากนกระจอก
ไนอะซีน (Niacine)	ช่วยรักษาระบบผิวหนังและระบบประสาท ป้องกันโรค pellagra ซึ่ง เป็นสาเหตุให้เกิดอาการท้องเสีย ประสาทไหว
ฟอสฟอรัส (Phosphorus)	ช่วยในการเจริญเติบโตของกระดูกและฟัน
แคลเซียม (Calcium)	ทำให้กระดูกแข็งแรง ป้องกันไม่ให้เป็นตะคริว

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ทองแดง (Copper) สร้างเม็ดโลหิตและฮีโมโกลบิน (hemoglobin)

ธาตุเหล็ก (Iron) ป้องกันโรคโลหิตจาง

โปรตีน (Protein) เสริมสร้างส่วนที่สึกหรอ

ไขมัน (Fat) ให้พลังงานแก่ร่างกาย

คาร์โบไฮเดรท (Carbohydrate) ให้พลังงานแก่ร่างกาย

กากหรือใยอาหาร (Fiber) ช่วยให้ท้องไม่ผูก และป้องกันมะเร็งในลำไส้

ข้าวซ้อมมือ เป็นชื่อที่ใช้เรียกข้าวประเภทที่เอาเปลือกออกโดยการตำ ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้กันในสมัยโบราณ ชาวบ้านโดยทั่วไปใช้วิธีตำกินกันเอง จึงเรียกข้าวที่ตำว่าข้าวซ้อมมือ แต่ในปัจจุบันใช้เครื่องจักรในการสีข้าวแทนและเรียกข้าวที่สีเอาเปลือกออกว่า ข้าวกล้อง

ข้าวขาวหรือข้าวสาร (White rice, polished rice)

รูปที่ 1.12 เมล็ดข้าวสาร หรือข้าวขาว

ข้าวขาวหรือข้าวสารคือข้าวที่เกิดจากการสี ขัดหลายๆครั้ง จนเยื่อหุ้มเมล็ด และจมูกข้าวหลุดออกไปหมดเหลือแต่เนื้อในของข้าวที่เป็นส่วนของแป้ง

ตารางที่1. 3 เปรียบเทียบคุณค่าทางโภชนาการของข้าวกล้อง และข้าวจ้าวชนิดขัดขาวก่อนหุง (http//www.dss.go.th)

ส่วนประกอบข้าว 100 กรัม	ข้าวกล้อง	ข้าวจ้าว
ความชื้น (กรัม)	11.2	10.2
โปรตีน (กรัม)	7.4	6.6
ไขมัน(กรัม)	2.4	0.8
ใยอาหาร(กรัม)	2.8	0.6
เถ้า(กรัม)	1.3	0.4
คาร์โบไฮเดรททั้งหมด (กรัม)	77.4	82.0
ค่าพลังงานความร้อน (กิโลแคลอรี่)	362	361
แคลเซียม (มิลลิกรัม)	12	8
ฟอสฟอรัส(มิลลิกรัม)	255	87
เหล็ก (มิลลิกรัม)	1.0	1.2

โซเดียม (มิลลิกรัม)	12	31
โพแทสเซียม (มิลลิกรัม)	326	111
ทองแดง(มิลลิกรัม)	0.1	0.1
สังกะสี (มิลลิกรัม)	0.5	0.1
วิตามินเอ (มิลลิกรัม)	1.0	0
วิตามินบี 1 (มิลลิกรัม)	0.29	0.07
วิตามินบี 2 (มิลลิกรัม)	0.04	0.02
ไนอะซีน (มิลลิกรัม)	5.5	1.8

1.5 กระบวนการหมักน้ำส้มสายชูจากข้าวโดยใช้ลูกแป้งและแบคทีเรียน้ำส้ม

กระบวนการหมักน้ำส้มสายชูจากข้าวโดยใช้ลูกแป้งและแบคทีเรียน้ำส้ม แบ่งออกเป็นสองขั้นตอนหลักคือขั้นตอนแรกการหมักแอลกอฮอล์จากข้าวโดยใช้ลูกแป้ง และ ขั้นตอนที่สองการผลิตกรดน้ำส้มจากแอลกอฮอล์ที่หมักได้จากขั้นตอนแรกโดยแบคทีเรียน้ำส้มซึ่งมีวิธีการดำเนินงานดังต่อไปนี้

1.5.1 ขั้นตอนแรก การหมักแอลกอฮอล์จากข้าวโดยใช้ลูกแป้ง (http:// www. diw.go.th)

1.5.1.1 การล้าง และการแช่ข้าว

การล้างข้าวทำเพื่อชะล้างส่วนที่เป็นรำข้าวที่ติดอยู่บริเวณผิวข้าวที่ขัดแล้วออกไป พร้อมกับสิ่งเจือปนอื่นๆ เช่น แกลบ ฟาง และช่วยลดระดับการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ได้ ส่วนการแช่ข้าวมีจุดประสงค์เพื่อให้ข้าวอมน้ำประมาณร้อยละ25-30 โดยน้ำหนักก่อนที่จะนำไปนึ่งสุก น้ำจะซึมผ่านเข้าไปกระจายอยู่ทั่วบริเวณเอนโดสเปิร์ม ของเมล็ดข้าว ทำหน้าที่เป็นตัวนำความร้อนไปทำให้เม็ดแป้งเกิดเจลาติไนซ์ (gelatinize)ระหว่างการนึ่ง และยังเป็นการปรับปรุงอนุภาคของแป้งในเมล็ดข้าวให้มีคุณสมบัติที่ดีขึ้น การแช่ข้าวใช้เวลานาน 3-4 ชั่วโมง น้ำที่ใช้ในการล้างและแช่ข้าวต้องเป็นน้ำสะอาดคุณภาพน้ำบริโภคเช่นเดียวกับน้ำที่ใช้เป็นส่วนประกอบในการหมัก

1.5.1.2 การนึ่งข้าว

การนึ่งข้าวมีจุดประสงค์เพื่อทำให้แป้งเกิดจิลาติไนซ์ ที่มีการจัดโครงสร้างของแป้งให้อยู่ในรูป alpha form และทำให้โปรตีนเสียสภาพอยู่ในฟอร์มที่ง่ายต่อการเข้าตัดของเอนไซม์ของเชื้อรา การนึ่งข้าวจะใช้เวลาประมาณ 30-60 นาที หลังจากการนึ่งแล้วทำให้เย็นลงโดยการพรมน้ำ และเพื่อเป็นการปรับความชื้นให้ได้ประมาณร้อยละ 50 ก่อนนำไปเติมหัวเชื้อ

1.5.1.3 การหมักแอลกอฮอล์ (น้ำส่า หรือ ไวน์ข้าว)

การหมักเริ่มด้วยการนำข้าวนึ่งสุกมาเติมเชื้อรา และยีสต์ ซึ่งอาจจะใช้ลูกแป้ง หรือเชื้อบริสุทธิ์ก็ได้ ทิ้งไว้ประมาณ 3 วัน วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ได้ประมาณ 4.0 วัดความหวานได้ประมาณ 37-47 องศาบริกซ์ (ขึ้นอยู่กับชนิดของข้าว) จากนั้นเติมน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และมีคุณ ภาพน้ำ

บริโภคลงไปเพื่อเจือจางความหวานหรือเพื่อปรับค่าบริกซ์ให้มีค่าประมาณ 20-20°Brix แล้วปล่อยให้เกิดการหมักต่อไปอีกประมาณ 4-7 วัน หรือวัดความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ได้ประมาณร้อยละ 10-12 จากนั้นกรองเอาส่วนที่เป็นน้ำส่าไปเก็บในถังพักและเติมสารเพื่อฆ่าเชื้อและหยุดการทำงานของจุลินทรีย์

1.5.2 ขั้นตอนที่สอง การผลิตกรดน้ำส้มจากน้ำส่า หรือไวน์ข้าว

นำน้ำส่ามาผสมกับหัวเชื้อแบคทีเรียน้ำส้มในอัตราส่วนที่พอเหมาะ ภาชนะที่ใช้ควรเป็นภาชนะปากกว้าง หรือเป็นถังที่มีการให้อากาศอย่างเพียงพอ ปล่อยทิ้งไว้จนกว่าจะมีปริมาณของกรดน้ำส้มมากกว่าร้อยละ 4 (w/v) จึงนำไปกรอง ฆ่าเชื้อ ทำให้ใส บ่มให้มีกลิ่นรสที่ดี และบรรจุในบรรจุภัณฑ์ที่เหมาะสมต่อไป

1.6 กรรมวิธีการผลิตน้ำส้มสายชูหมัก (Malai Boonyaratanakornkit, 2004)

กรรมวิธีการผลิตแบ่งออกได้เป็น 3 ชนิดคือ

1.6.1 วิธีการหมักอย่างช้า (The Orleans process or slow process)

เป็นวิธีการหมักตามธรรมชาติโดยการปล่อยให้วัตถุดิบที่มีปริมาณน้ำตาลสูงพอควร เช่นผลไม้นั้นถูกเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์โดยเชื้อยีสต์ที่ปะปนมากับวัตถุดิบ หรือเชื้อยีสต์บริสุทธิ์ที่ใส่ลงไป จากนั้นเชื้อน้ำส้มสายชูที่อยู่ในธรรมชาติจะเปลี่ยนแอลกอฮอล์ให้เป็นกรดน้ำส้มต่อไป วิธีนี้การหมักต้องใช้เวลานานประมาณ 2-3 เดือน ประสิทธิภาพของเชื้อ และคุณภาพของน้ำ ส้มสายชูหมักที่ได้ไม่แน่นอน วิธีนี้สามารถปรับปรุงให้ดีขึ้นและเร็วขึ้นได้โดยการเติมหัวเชื้อน้ำส้มที่ได้จากการหมักในรุ่นก่อนๆลงไปประมาณร้อยละ 33 ของปริมาณทั้งหมดที่จะหมัก

1.6.2 วิธีการหมักอย่างเร็ว (The Quick Vinegar process)

วิธีนี้ต้องใช้เครื่องมือที่มีการออกแบบให้สามารถควบคุมสภาวะให้เหมาะสมกับแบค ทีเรียน้ำส้มในการที่จะออกซิไดซ์แอลกอฮอล์ให้เป็นกรดน้ำส้ม เครื่องมือที่พัฒนาขึ้นมามีหลายแบบ เช่น อาจจะมีการกวนพร้อมกับการให้อากาศ หรือปล่อยให้ส่วนผสมของสารละลายแอลกอฮอล์กับแบคทีเรียน้ำส้มไหลผ่านวัสดุปูรอง (supporting material) เช่น เศษไม้ชิ้นเล็กๆ หรือซังข้าวโพด โดยควบคุมให้มีการไหลผ่านช้าๆหมุนเวียนหลายครั้งจนได้ความเข้มข้นของกรดน้ำส้มตามที่ต้องการ แบคทีเรียน้ำส้มจะไปเกาะอยู่บนวัสดุปูรอง เป็นการเพิ่มพื้นที่ในการสัมผัสของแอลกอฮอล์ และอากาศกับเซลของแบคทีเรีย เครื่องมือแบบนี้ต้องมีการให้อากาศผ่านทางก้นถัง และควรรักษาอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 15-34 °C ข้อดีของวิธีนี้คือ ความเป็นกรดจะเพิ่มขึ้นประมาณร้อยละ 0.5 – 0.7 ต่อ 24 ชั่วโมง

1.6.3 วิธีการหมักโดยใช้เครื่องที่เรียกว่า “Acetator”

การหมักน้ำส้มสายชูโดยวิธีนี้เป็นการหมักในถังหมักทรงสูงที่มีลักษณะเป็นถังปิดมีการให้อากาศอย่างพอเพียงเข้าสู่น้ำหมักในลักษณะที่เป็นฟองละเอียด ทำให้แบคทีเรียน้ำส้มกระจายอยู่ในน้ำหมักอย่างทั่วถึง สามารถใช้สารอาหารกับแอลกอฮอล์ และออกซิเจนที่ละลายอยู่ในน้ำเพื่อการเจริญเติบโตและผลิตกรดน้ำส้มได้เพิ่มขึ้นร้อยละ 3-4 ต่อ 24 ชั่วโมง

1.7 ปัจจัยที่ต้องการในการหมักน้ำส้มสายชู (จิรวุธ ,ธงชัย, นันทนิตย์ , 2541)

1.7.1 ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์

ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดน้ำส้มคือประมาณร้อยละ 10-13 ไม่นิยมใช้มากกว่าร้อยละ14 เนื่องจากจะทำให้ปฏิกิริยาการออกซิไดซ์ แอลกอฮอล์ เป็นกรดน้ำส้มเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ ทำให้ได้กรดน้ำส้มลดลง แต่ถ้าใช้แอลกอฮอล์น้อยกว่าร้อยละ 10 จะเกิดปฏิกิริยา over oxidation กรดน้ำส้มถูกเปลี่ยนเป็นกาซคาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำ นอกจากนี้ถ้าเชื้อน้ำส้มเปลี่ยนแอลกอฮอล์เป็นกรดน้ำส้มหมดแล้ว มีการเติมน้ำส่าช้าไป จะทำให้เซลของแบคที เรียน้ำส้มถูกทำลายเนื่องมาจากการขาดแอลกอฮอล์และความเข้มข้นของกรดน้ำส้ม

1.7.2 ปริมาณออกซิเจน

ปฏิกิริยาการเปลี่ยนแอลกอฮอล์เป็นกรดน้ำส้มเป็นปฏิกิริยาแบบออกซิเดชั่นมีความจำเป็นมากในการใช้ออกซิเจน จึงต้องมีการให้อากาศอยู่ตลอดเวลา และให้แบคทีเรียน้ำส้มสัมผัสอากาศมากที่สุด ซึ่งมีวิธีการหนึ่งคือการใช้วัสดุปรุง (supporting material) เช่นซังข้าวโพด ก้อนหินหรือ ก้อนอิฐที่มีขนาดเล็กๆ ใส่ลงในถังหมักเพื่อให้แบคทีเรียน้ำส้มยึดเกาะ เป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสกับแอลกอฮอล์ และอากาศให้มากขึ้น การขาดออกซิเจนในช่วงระหว่างการหมักจะเกิดผลกระทบต่อแบคทีเรียน้ำส้มอย่างมาก เพราะเชื้อจะถูกทำลายลงอย่างรวดเร็ว เนื่องจากการสูญเสีย ATP ทำให้กิจกรรมต่างๆของเซลหยุดชะงักลง

1.7.3 ปริมาณกรดในน้ำหมัก

น้ำผลไม้ที่มีปริมาณแอลกอฮอล์พอเหมาะที่จะนำมาผลิตน้ำส้มสายชูจะต้องมีการปรับปริมาณกรดให้เหมาะสม เพื่อป้องกันการเจริญเติบโตของแบคทีเรียอื่น และเป็นการเสริมให้แบค ทีเรียน้ำส้มเจริญเติบโตได้มากขึ้น โดยปกติค่าความเป็นกรดควรอยู่ที่ร้อยละ 0.4-0.5 ในรูปของ Tataric acid

1.7.4 อุณหภูมิที่เหมาะสำหรับการหมัก

อุณหภูมิที่ใช้ในการหมักควรคุมให้อยู่ในช่วง 26-32 องศาเซลเซียส ถ้าอุณหภูมิต่ำเกินไปจะทำให้การหมักเกิดขึ้นช้าลง เนื่องจากแบคทีเรียน้ำส้มมีการเจริญช้ามาก แต่ถ้าอุณหภูมิสูงเกินไป จะมีผลทำให้กรดน้ำส้มระเหยไปได้ง่าย กลิ่นและรสของน้ำส้มสายชูหมักที่ได้ไม่ดี

1.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1.8.1 อนุรักษ์ ขจรบุญ ศิริรักษ์ ทับพุ่ม และนันทนิตย์ คงวัน,2539 การผลิตและเปรียบ เทียบคุณภาพน้ำส้มสายชูหมักจากน้ำสับปะรดและข้าวเหนียว

ในงานวิจัยทำการหมักน้ำส้มสายชูจากวัตถุดิบ 2 ชนิดคือ น้ำสับปะรด และข้าวเหนียว โดยการหมักแบ่งเป็น 2 ขั้นคือการหมักแอลกอฮฮล์ และการผลิตน้ำส้มสายชู ผลการทดลองสรุปได้ว่าในขั้นตอนการหมักแอลกอฮอล์ควรใช้น้ำสับปะรดที่มีความหวานเริ่มต้นประมาณ 20° Brix จึงจะได้แอลกอฮอล์ร้อยละ 13 (v/v) เมื่อหมักได้ 1 สัปดาห์ ส่วนข้าวเหนียว ควรใช้อัตราส่วนของลูกแป้งต่อข้าวเหนียวนึ่ง 1 : 1.5 จึงจะได้แอลกอฮอล์ร้อยละ10 (v/v) ในขั้นตอนการผลิตกรดน้ำส้มได้ทดลองหมัก

แบบธรรมชาติ และหมักในระบบหมักที่มีการเติมอากาศและมีวัสดุปูรองที่มีการปั๊มหมุนเวียนน้ำหมัก จากผลการทดลองพบว่าการหมักในระบบที่มีการเติมอากาศและมีวัสดุปูรองให้ความเข้มข้นของกรดน้ำส้มสูงกว่าการหมักแบบธรรมชาติ โดยให้กรดน้ำส้มร้อยละ 3 (w/v) เมื่อใช้เวลาการหมัก 1 สัปดาห์ แต่น้ำส้มสายชูที่หมักได้จะมีความขุ่นมากกว่าการหมักแบบธรรมชาติ

1.8.2 สราวุธ อยู่สบาย และ นันทนิตย์ คงวัน, 2540 การผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากเปลือกสับปะรดโดยระบบตรึงฟิล์ม

งานวิจัยเป็นการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากน้ำที่คั้นจากเปลือกสับปะรด เปรียบเทียบกันระหว่างการหมักแบบธรรมดาที่ไม่มีการให้อากาศ และการหมักในถังหมักแบบตรึงฟิล์ม (Fixed bed reactor) ที่มีซังข้าวโพดเป็นตัวกลางที่มีการหมุนเวียนน้ำหมักเป็นครั้งคราว ผลการทดลองพบว่าการหมักในถังตรึงฟิล์มได้ความเข้มของกรดน้ำส้มร้อยละ 4.12 (w/v) ในขณะที่การหมักแบบธรรมดาไม่มีการให้อากาศได้ความเข้มข้นของกรดน้ำส้มร้อยละ 2.22 (w/v) ที่ระยะเวลาการหมักเท่ากัน

1.8.3 จิรวุธ รัตนโอภาส ธงชัย พัฒนวรพันธุ์ และ นันทนิตย์ คงวัน, 2541 การศึกษาหาอัตราการป้อนน้ำหมักที่เหมาะสมในการผลิตกรดน้ำส้มโดยระบบตรึงฟิล์ม

งานวิจัยเป็นการศึกษาหาอัตราการป้อน (การหมุนเวียน) น้ำส่าที่เหมาะสมในการผลิตน้ำ ส้มสายชูหมักโดยใช้ถังหมักแบบตรึงฟิล์ม (Fixed bed reactor) ที่มี PVC rasching ring ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.0 เซนติเมตร ยาว 1.0 เซนติเมตร เป็นตัวกลาง น้ำส่าได้จากการหมักน้ำที่คั้นออกจากเปลือกสับปะรด โดยใช้เชื้อ **Saccharomyces cerevisiae** ในขวดแก้วปากแคบ ซึ่งจะได้ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ร้อยละ 13 (v/v) เมื่อหมักนาน 1 สัปดาห์ และเมื่อนำน้ำส่าไปทำการผลิตกรดน้ำส้มในถังหมักแบบตรึงฟิล์มที่มีการพ่นฝอยน้ำส่าตลอดเวลาจากทางด้านบนของตัวถังหมักผ่านชั้นของแบคทีเรียที่เกาะบนตัวกลาง และมีการหมุนเวียนน้ำส่าในอัตรา 0.6 0.8 1.0 และ 1.2 ลิตรต่อนาที ผลการทดลองพบว่า อัตราการหมุนเวียนน้ำส่า 0.8 ลิตรต่อนาทีให้ผลดีที่สุด โดยที่จะได้ความเข้มข้นของกรดน้ำส้มร้อยละ 2.13 (w/v) ในระยะเวลา 1 สัปดาห์

1.8.4 จักรกริศน์ พิมพ์ปรุ และคณะ, 2543 การศึกษาหัวเชื้อข้าวหมาก

เป็นการศึกษาเปรียบเทียบคุณภาพของลูกแป้งข้าวหมาก 3 ชนิดคือ ลูกแป้งนนทบุรี ลูกแป้งอู่ทอง และลูกแป้งวัดตึก การศึกษาพบว่าลูกแป้งแต่ละชนิดมีปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่ต่าง กันออกไป โดยลูกแป้งนนทบุรีมีปริมาณเชื้อยีสต์ 1.03 x 10^5 CFU เชื้อรา 4.50 x 10^6 CFU เป็นลูกแป้งที่เมื่อนำมาหมักเป็นข้าวหมากแล้วสามารถหมักได้เร็ว มีน้ำมาก และมีกลิ่นหอมได้รับการยอมรับจากผู้บริโภคมากที่สุด

1.8.5 แสงไทย เค้าภูไทย, 2545 ขุมทองเหล้าไทย ไวน์ผลไม้

การศึกษาพบว่าเชื้อแป้งหมักแบ่งได้เป็น 3 ชนิดดังนี้คือ ชนิดที่เปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลอย่างเดียวเรียกว่า แป้งหวาน หรือแป้งข้าวหมาก ชนิดต่อมาคือทำหน้าที่สองอย่างคือเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลและเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ เรียกว่า แป้งเล็ก แป้งกลาง ตามขนาดของลูกแป้ง ชาวบ้านเรียก

แป้งเหล้า ส่วนชนิดที่สามเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์อย่างเดียว เรียกว่า แป้งใหญ่ เนื่องจากมีขนาดใหญ่ที่สุด และมีปริมาณยีสต์มากที่สุด

1.8.6 Kumiko Nanda, Mariko Taniguchi, Satoshi Ujiki , Nobuhiro Ishihara, Hirotaka Mori, Hisayo Ono, and Yashikatsu Murooka ,2001 Characterization of Acetic Acid Bacteria in Traditional Acetic Acid Fermentation of Rice Vinegar (Komesu) Unpolished Rice Vinegar (Kurosu) Produced in Japan.

ในงานวิจัยเป็นการแยกเชื้อบริสุทธิ์จาก Japanese rice vinegar และ Unpolished rice vinegar ซึ่งใช้กระบวนการแบบดั้งเดิมที่ไม่ได้ใช้เชื้อบริสุทธิ์ในกระบวนการหมัก เชื้อที่แยกได้มี 178 ชนิด และแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มโดยใช้ลักษณะทางด้านพันธุกรรม ผลการทดลองพบว่าเชื้อที่แยกได้มีลักษณะทางพันธุกรรมคล้ายกับ **Acetobacter pasteurianus.** และเป็นสายพันธุ์เด่นที่พบในปริมาณมากกว่าชนิดอื่นในช่วงของการหมักเพื่อผลิตกรดน้ำส้ม

1.8.7 San Chiang Tan , 2005 Vinegar fermentation

ทำการทดลองหมักน้ำส้มสายชูเปรียบเทียบระหว่างการหมักใน generator ที่มีการหมุนเวียนน้ำหมักผ่านแบคทีเรียที่เกาะบนวัสดุปรุอง และการหมักแบบsubmerge ที่มีการเป่าอากาศลงไปในน้ำหมัก ผลการทดลองพบว่าการหมักในgenerator มีการสูญเสียแอลกอฮอล์ และกรดน้ำส้มมาก กว่าเนื่องจากมีผิวหน้ากว้าง แบคทีเรียน้ำส้มมีการเจริญเติบโตช้า ต้องใช้เวลานานจึงจะเริ่มการหมักได้ในขณะที่การหมักแบบ submerge มีการสูญเสียแอลกอฮอล์ และกรดน้ำส้มน้อยกว่า แบคทีเรียน้ำส้มสามารถเจริญได้ดี ดังนั้นจึงได้ประสิทธิภาพที่สูงกว่า

1.8.8 Fragapane Giuseppe, Rubio-Fernandez Hipolito, Desamparados Salvador Maria, 2006 Continuous production of wine vinegar in bubble colume reactors of up to 60 litre capacity

ผลการทดลองพบว่าควรควบคุมอุณหภูมิของการหมักที่ 30 °C อัตราการการให้อากาศ 0.25 min/l (wm) และ อัตราการไหลของน้ำหมักเข้าระบบ 950 ml/h จะได้ความเข้มข้นของกรดน้ำส้ม 92 g/l มีค่า overall productivity 1.41 g/l/h และ yield 94.2%

1.8.9 G.S. Kocher, K.L. Kalra and R.P. Phutela, 2006 Comparative Production of Sugarcane Vinegar by Different Immobilization Techniques

งานวิจัยใช้เชื้อยีสต์**Saccharomyces cerevisiae** ในการหมักเอทธานอลจากน้ำอ้อยซึ่งได้ความเข้มข้นของเอทธานอล 8% (v/v) เอธานอลที่ได้ถูกนำไปใช้ในการหมักน้ำส้มสายชูโดยใช้วิธี submerge และ semi-continuous fermentation ใน pack bed colume ที่มีการตรึงเซลของแบคที เรียน้ำส้ม (**Acetobacter aceti** NRRL. 746) 2 วิธี คือการดูดซับเซลไว้บนผิวของตัวกลาง 3 ชนิด คือ ชานอ้อย ซังข้าวโพด ขี้เลื่อย และการห่อหุ้มเซลด้วย calcium alginate ผลการทดลองพบว่าการตรึงเซลไว้ที่ผิวของตัวกลางทั้ง 3 ชนิดให้ผลดีใกล้เคียงกัน คือในระบบที่เป็น submerge fermentation สามารถผลิตกรดได้ 6.7% ภายในเวลา 28 วัน และเมื่อมีการ recycle เซลที่เกาะที่ผิวของชานอ้อยจะทำให้ระยะเวลา

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

การหมักสั้นลงเหลือ 13 วัน และในระบบที่เป็น semi-continuous fermentation ระยะเวลาในการหมักจะลดลงเหลือเพียง 80 ชั่วโมง

1.9 จุดประสงค์ของงานวิจัย

1.9.1 เปรียบเทียบการหมักโดยใช้ข้าวเต็มเมล็ด และ ปลายข้าว 3 ชนิด ได้แก่ ข้าวจ้าว ข้าวกล้อง และข้าวเหนียวขาว เป็นวัตถุดิบ

1.9.2 ศึกษากระบวนการผลิตที่เหมาะสม เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์น้ำส้มสายชูหมักที่มีคุณภาพตามที่กำหนดไว้ในมาตรฐานอาหาร กล่าวคือต้องมีกรดน้ำส้มไม่น้อยกว่า 4 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บทที่ 2
วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

2.1 วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี

2.1.1 วัตถุดิบที่ใช้ในการหมักได้แก่ ข้าวจ้าว ข้าวเหนียว ข้าวกล้อง

2.1.2 เชื้อจุลินทรีย์

2.1.2.1 ลูกแป้งส่าเหล้า

เป็นลูกแป้งส่าเหล้าจากกลุ่มแม่บ้านจังหวัดมหาสารคาม

2.1.2.2 แบคทีเรียน้ำส้ม **Acetobacter aceti** TISTR 102

มีลักษณะเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่ผ่านกระบวนการทำแห้ง และบรรจุอยู่ใน ampule ที่จัดจำหน่ายโดยศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ซึ่งจะต้องนำมาเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อขยายปริมาณ และจำนวนต่อไป

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

2.1.3 โหลแก้วสำหรับหมักแอลกอฮอล์ (น้ำส่า หรือไวน์ข้าว)

ลักษณะเป็นโหลแก้วทรงกระบอกปากเปิด ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 22 เซนติเมตร สูง 32 เซนติเมตรจำนวน 9 ใบ

2.1.4 ถังหมัก และปั๊มเป่าอากาศสำหรับผลิตกรดน้ำส้ม

- ตัวถังหมักทำด้วยวัสดุที่เป็นพีวีซีใส ทรงกระบอก มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 14 เซนติเมตร ความหนา 0.5 เซนติเมตร ความสูง 35 เซนติเมตร การให้อากาศใช้การต่อท่อจาก ปั๊มเป่าอากาศเข้าที่ข้างถังทางด้านล่าง โดยที่แผ่นฐานด้านล่างของตัวถังมีการเจาะรูทั่วทั้งแผ่นเพื่อให้ฟองอากาศกระจายในน้ำหมักอย่างทั่วถึง ด้านบนของถังหมักมีฝาที่สามารถเปิดได้ บนฝาจะมีการต่อท่อไว้ 2 ท่อที่มีขนาดใหญ่และเล็กดังในรูป ท่อใหญ่มีไว้เพื่อการเก็บตัวอย่าง ท่อเล็กจะต่อกับสายยางที่จุ่มปลายในน้ำเพื่อลดความดันที่เกิดขึ้นภายในถังขณะทำการหมัก

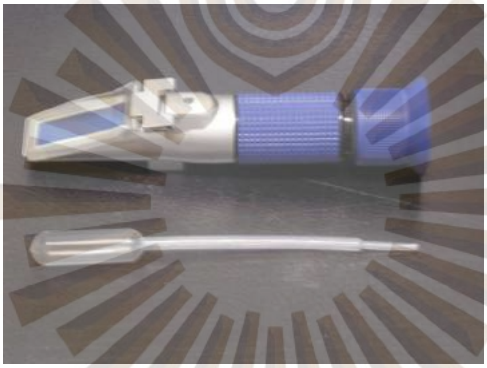
- ปั๊มเป่าอากาศ เป็น Electrical Magnetic Air Compressor Model ACO-318

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

2.1.5 ชุดนึ่งข้าวไฟฟ้า

เป็น Electric Pan with Steam Plate HANABISHI Multi-purpose HTP 360S จำนวน 2 ชุด

2.1.6 Portable refractometer RHW-25 สำหรับใช้วัดความเข้มข้นของแอลกอฮอล์



2.1.7 สารเคมีที่ใช้ในการขยายหัวเชื้อ และ ใช้ในการเลี้ยงแบคทีเรียน้ำส้มได้แก่ น้ำตาลกลูโคส สารสกัดยีสต์ (yeast extract) แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) และน้ำกลั่น

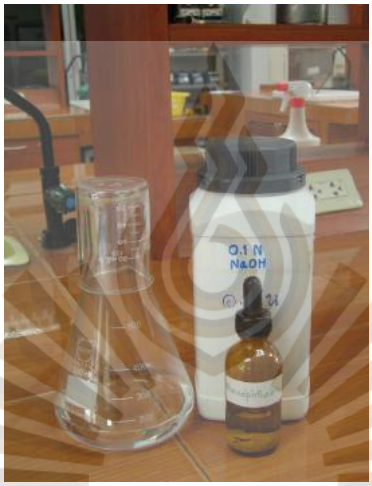
มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

สูตรอาหารเลี้ยงแบคทีเรียน้ำส้มประกอบด้วย

กลูโคส (glucose)	100	กรัม
สารสกัดยีสต์ (yeast extract)	10	กรัม
น้ำกลั่น (distilled water)	1	ลิตร

ถ้าเป็นอาหารแข็งให้เติมผงวุ้น (Agar powder) ร้อยละ 2 (w/v) และแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) ร้อยละ 1 (w/v)

2.1.8 สารเคมี และอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณกรดน้ำส้ม



สารที่ใช้ในการวิเคราะห์กรดน้ำส้มประกอบด้วยน้ำกลั่นที่ต้มเดือดใหม่ๆ สารละลาย NaOH ความเข้มข้น 0.1N และ phenolphthalein อินดิเคเตอร์

ชุดไตเตรทกรดน้ำส้ม

นำตัวอย่างน้ำส้มสายชูหมักที่ผลิตได้มาไตเตรทกับสารละลายNaOH ความเข้มข้น 0.1 N จุดสิ้นสุดของการไตเตรทของเหลวจะเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีชมพู

2.2 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

ขั้นตอนการวิจัยแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนหลัก คือ

- ขั้นตอนที่ 1 การหมักแอลกอฮอล์จากข้าวทั้งสามชนิด โดยใช้ลูกแป้งส่าเหล้า
- ขั้นตอนที่ 2 การผลิตกรดน้ำส้มจากแอลกอฮอล์ในถังเป่าอากาศโดยแบคที่เรียน้ำส้มสายพันธุ์ **Acetobacter aceti** TISTR 102

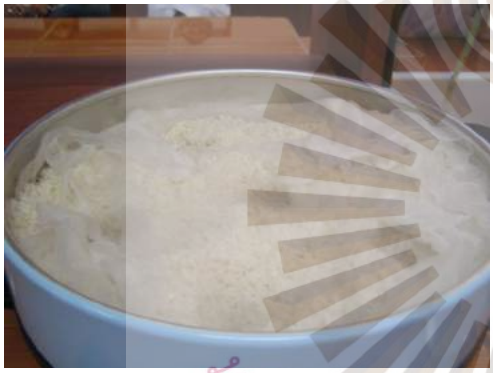
2.2.1 กระบวนการหมักแอลกอฮอล์จากข้าวทั้งสามชนิดโดยใช้ลูกแป้งส่าเหล้า

หมายเหตุ การผ่าน้ำคือ การเติมน้ำ หรือน้ำเชื่อมลงไป จุดประสงค์เพื่อเพิ่มปริมาณของของเหลว

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ล้างและ แช่ข้าวในน้ำสะอาด

เทน้ำทิ้งแล้วนึ่งข้าวในหม้อนึ่ง



ล้างเมือกออกจากข้าวที่นึ่งแล้วด้วยน้ำสะอาด

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ผึ่งข้าวให้แห้งในตะแกรง

บดลูกแป้งส่าเหล้าพอละเอียด

บรรจุข้าวนึ่งลงในโหลแก้วสลับกับการโรยลูกแป้งที่บดแล้วเป็นชั้นจนเกือบเต็ม

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ปิดทับด้วยผ้าขาวบาง และกระดาษฟอยล์

ปล่อยไว้ให้เกิดการหมักนาน 3 วัน แล้วทำการผ่าน้ำเพื่อเพิ่มปริมาณของเหลว หมักต่อนานประ มาณ 3 สัปดาห์ ถึง 1 เดือนจนได้ปริมาณแอลกอฮอล์มากกว่าร้อยละ 10 และมีปริมาณคงที่ จาก นั้น กรองน้ำส่า หรือไวน์ข้าว ที่หมักได้แล้วนำไปใช้ในการผลิตกรดน้ำส้มในขั้นตอนที่ 2 ต่อไป

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

2.2.2 การผลิตกรดน้ำส้มโดยแบคทีเรียน้ำส้มจากน้ำส่าหรือไวน์ข้าวที่หมักได้จากข้าวทั้งสาม ชนิดในถังเป่าอากาศ เพื่อศึกษาปัจจัยต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการผลิต ได้แก่

2.2.2.1 ผลของการเติมสารเสริมการเจริญเติบโต ที่มีต่อกระบวนการผลิตกรดน้ำส้มของแบคทีเรียน้ำส้ม ในการทดลองใช้สารเสริมสองชนิดคือ $NH_4H_2PO_4$ และ KH_2PO_4

2.2.2.2 ปริมาณแบคทีเรียน้ำส้มเริ่มต้ม (inoculum size)ที่เหมาะสม

2.2.2.3 ความเข้มข้นของแอลกอฮล์เริ่มต้น (initial concentration of alcohol)

การหมักในถังหมักแบบเป่าอากาศ

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 ขั้นตอนที่ 1 ผลของ การหมักแอลกอฮอล์จากข้าว (การหมักน้ำส่า หรือไวน์ข้าว) โดยการใช้ลูกแป้งส่าเหล้า

3.1.1 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการแช่น้ำ และการนึ่งข้าว

การทดลองใช้ปริมาณน้ำในการแช่ในอัตราส่วนข้าว : น้ำ เท่ากับ 1 : 1.5 วัตถุดิบที่เป็นปลายข้าวใช้เวลาในการแช่น้ำนาน 5-10 นาที และใช้เวลาในการนึ่งประมาณ 30 นาที ส่วนข้าวเต็มเมล็ดต้องใช้เวลาในการแช่นานประมาณ 6 ชั่วโมง และใช้เวลาในการนึ่งนาน 30 นาที จึงจะได้ข้าวที่สุกพอดีไม่เป็นไตแข็ง และไม่แฉะ

3.1.2 สภาวะการหมักแอลกอฮอล์

การหมักจะใช้ข้าวนึ่งที่ล้างเมือก และสะเด็ดน้ำแล้วนั้นมาผสมกับแป้งส่าเหล้าที่บดพอละเอียด แล้วในอัตราส่วน 7 กรัมน้ำหนักแห้ง ต่อ ข้าวนึ่ง 1 กิโลกรัม เมื่อผ่านไป 3 วันจะสังเกตเห็นว่าข้าวจะมีการลอยตัวขึ้น(รูปที่ 3.1) และมีส่วนของของเหลวอยู่ด้านล่าง จึงทำการผ่าน้ำด้วยน้ำเชื่อมที่ความเข้มข้น 12-14 °Brix และหมักต่อนานประมาณ 3 สัปดาห์ ถึง 1 เดือน จะได้ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ในน้ำส่าร้อยละ 15-17 (w/v) เมื่อวัดด้วย Portable Refractometer RHW-25 ส่วนการหมักที่อุณหภูมิห้อง การหมักในที่เย็นและ การหมักที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืดให้ผลไม่ต่างกัน แต่การหมักในที่มืดลักษณะปรากฏของน้ำส่าที่ได้จะค่อนข้างขุ่น วัตถุดิบที่เป็นข้าวกล้องโดยเฉพาะอย่างยิ่งข้าวกล้องเต็มเมล็ด จะใช้เวลาในการหมักนานกว่าข้าวชนิดอื่นจึงจะได้ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ที่ใกล้เคียงกันและให้ปริมาณน้ำส่าน้อยกว่า

รูปที่ 3.1 การลอยตัวของข้าวในระหว่างการหมักแอลกอฮอล์

3.2 ขั้นตอนที่ 2 ผลของการผลิตกรดน้ำส้มจากแอลกอฮอล์ที่หมักได้จากขั้นตอนที่ 1 โดยใช้แบคทีเรียน้ำส้ม (**Acetobacter aceti** TISTR 102)

3.2.1 การศึกษาผลของการเติมสารเสริมการเจริญเติบโตประเภทเกลือฟอสเฟตลงในน้ำส่า ที่มีต่อการผลิตกรดน้ำส้มของแบคทีเรียน้ำส้ม

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

การทดลองใช้สารเสริมการเจริญเติบโต 2 ชนิด คือ $NH_4H_2PO_4$ และ KH_2PO_4 แต่ละชนิดใช้ปริมาณความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 กรัมต่อลิตร เติมลงในน้ำส่า ที่มีปริมาณแอลกอ ฮอล์ ร้อยละ10 และ ใช้อัตราส่วนของน้ำส่า กับปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1 : 1 โดยปริมาตร ซึ่งเมื่อทำการผสมเชื้อลงในน้ำส่าแล้วจะทำให้ปริมาณแอลกอฮอล์เริ่มต้นของกระบวนการผลิตกรดอยู่ที่ประมาณร้อยละ 8 จากนั้นทำการให้อากาศเป็นเวลานาน 7 วัน แล้วจึงเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณกรดน้ำส้มที่ได้

ตารางที่ 3.1 เปรียบเทียบปริมาณกรดน้ำส้มที่แบคทีเรียผลิต ระหว่างการใช้น้ำส่าที่ไม่เติมและน้ำส่าที่ เติมสารเสริมการเจริญเติบโต $NH_4H_2PO_4$ และ KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 กรัม ต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 7 วัน

ชนิดและความเข้มข้นของสารเสริมการเจริญเติบโต	ปริมาณกรดน้ำส้มที่ผลิต (ร้อยละw/v)
ไม่เติมสาร (Control)	0.84
$NH_4H_2PO_4$ 0.5 กรัมต่อลิตร	0.90
1.0 กรัมต่อลิตร	1.08
KH_2PO_4 0.5 กรัมต่อลิตร	1.05
1.0 กรัมต่อลิตร	1.08

จากตารางนี้จะเห็นได้ว่าการเติมสารเสริมการเจริญเติบโตของแบคทีเรียน้ำส้มทั้งสองชนิดมีแนว โน้มที่จะทำให้มีการผลิตกรดน้ำส้มได้มากขึ้นเมื่อเทียบกับน้ำส่าที่ไม่เติมสาร โดยสารเสริมทั้งสองชนิดให้ผลใกล้เคียงกัน

3.2.2 การศึกษาปริมาณเชื้อ(Inoculum size) และปริมาณแอลกอฮอล์เริ่มต้นที่เหมาะสม

จากการทดลองที่ 3.2.1 จะเห็นได้ว่าปริมาณกรดน้ำส้มที่ได้มีค่าต่ำ ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่าเป็นผลเนื่องมาจากการใช้ปริมาณของแอลกอฮอล์ และปริมาณเชื้อเริ่มต้นไม่เหมาะสม ดังนั้นในการทดลองนี้จึงทำการศึกษาถึงปัจจัยทั้งสองที่จะมีผลต่อการผลิตกรดน้ำส้มโดยใช้น้ำส่าที่มีปริมาณแอลกอฮอล์เริ่มต้นประมาณร้อยละ 17 เป็นวัตถุดิบ แล้วนำมาเติมเชื้อน้ำส้มที่อยู่ในรูปของของเหลวในอัตราส่วนของน้ำส่ากับปริมาณเชื้อ ที่ต่างๆกัน คือ 90 : 10 80 : 20 70 : 30 60 : 40 และ 50 : 50 หรือร้อยละ10 20 30 40 และ 50 โดยปริมาตร ตามลำดับ จากนั้นให้อากาศแบบมากเกินพอตลอดเวลา

เป็นเวลา 10 วัน จนปริมาณกรดที่เกิดขึ้นมีค่าคงที่ เก็บตัวอย่างมาทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดน้ำส้มที่เกิดขึ้น ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เพื่อทวนสอบผล การใช้อัตราส่วนของน้ำส่าและปริมาณเชื้อที่ต่างกัน จะมีผลทำให้ปริมาณแอลกอฮอล์เริ่มต้นที่จะเข้าสู่กระบวนการผลิตกรดน้ำส้มแตกต่างกันไปดังนี้

ตารางที่ 3.2 ความสัมพันธ์ของ inoculum size กับ ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์เริ่มต้นการหมัก

inoculum size ร้อยละ (v/v)	ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ ร้อยละ (v/v)
10	17
20	15
30	13
40	11
50	9

ตารางที่ 3.3 ปริมาณร้อยละของกรดน้ำส้ม ที่แบคทีเรียน้ำส้มผลิตขึ้นเมื่อใช้ inoculum size ร้อย ละ10 (v/v)ที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	ปริมาณกรดน้ำส้ม(ร้อยละ w/v)
3	0.72
4	0.84
7	1.08
10	1.35

ตารางที่ 3.4 ปริมาณร้อยละของกรดน้ำส้ม ที่แบคทีเรียน้ำส้มผลิตขึ้นเมื่อใช้ inoculum size ร้อย ละ20 (v/v)ที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	ปริมาณกรดน้ำส้ม(ร้อยละ w/v)
3	0.90
4	1.14
7	1.59
10	1.50

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ตารางที่ 3.5 ปริมาณร้อยละของกรดน้ำส้ม ที่แบคทีเรียน้ำส้มผลิตขึ้นเมื่อใช้ inoculum size ร้อยละ 30 (v/v)ที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	ปริมาณกรดน้ำส้ม(ร้อยละ w/v)
3	1.35
4	1.83
7	3.84
10	3.99

ตารางที่ 3.6 ปริมาณร้อยละของกรดน้ำส้ม ที่แบคทีเรียน้ำส้มผลิตขึ้นเมื่อใช้ inoculum size ร้อยละ 40 (v/v)ที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	ปริมาณกรดน้ำส้ม(ร้อยละ w/v)
3	1.38
4	1.98
7	3.80
10	3.70

ตารางที่ 3.7 ปริมาณร้อยละของกรดน้ำส้ม ที่แบคทีเรียน้ำส้มผลิตขึ้นเมื่อใช้ inoculum size ร้อยละ 50 (v/v)ที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	ปริมาณกรดน้ำส้ม(ร้อยละ w/v)
3	1.32
4	1.44
7	1.50
10	2.46

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ตารางที่ 3.8 เปรียบเทียบปริมาณกรดน้ำส้มสูงสุดที่หมักได้ที่ระยะการหมัก 10 วันเมื่อใช้ inoculum size ต่างๆ

inoculum size (ร้อยละv/v)	ปริมาณกรดน้ำส้ม (ร้อยละ w/v)
10	1.35
20	1.50
30	3.99
40	3.70
50	2.46

จากตารางที่ 3.2 ถึง 3.8 จะเห็นได้ว่าการใช้อัตราส่วนของน้ำส่า กับปริมาณเชื้อ ในปริมาณ 70 : 30 (inoculum size ร้อยละ 30 v/v) และ 60 : 40 (inoculum size ร้อยละ 40v/v) ซึ่งจะทำให้มีความเข้ม ข้นของแอลกอฮอล์เริ่มต้นประมาณร้อยละ 13 และ 11 (w/v)ตามลำดับ นั้นจะให้กรดน้ำส้มปริมาณสูงใกล้เคียงกัน ในระยะเวลาการหมัก 7 วัน แต่เมื่อหมักไป 10 วัน การใช้ inoculum size ร้อยละ 30 v/v ยังมีการผลิตกรดน้ำส้มเพิ่มขึ้นจนถึงในปริมาณที่สามารถใช้เป็นน้ำส้มสายชูหมักได้ ดังนั้นจากตารางนี้จึงสามารถสรุปได้ในเบื้องต้นว่าการผลิตกรดน้ำส้มควรใช้ปริมาณแอลกอฮอล์เริ่มต้นประมาณร้อยละ13

3.2.3 การศึกษาหาปริมาณที่เหมาะสมของสารเสริมการเจริญเติบโตของแบคทีเรียน้ำส้มในรูปของเกลือฟอสเฟตที่จะใช้เติมในน้ำส่า

จากผลการทดลองในตารางที่ 3.1 จะเห็นได้ว่าการเติมสารอาหารเสริมประเภทเกลือฟอสเฟตลงในน้ำส่าจะสามารถกระตุ้นให้แบคที่เรียน้ำส้มสามารผลิตกรดน้ำส้มได้เร็วขึ้นได้ ดังนั้นจึงทำการทดลองเพื่อหาปริมาณที่พอเหมาะในการเติมโดยใช้ $NH_4H_2PO_4$ เติมลงในน้ำส่าในปริมาณที่ต่างกันดังนี้คือ 0.03 0.05 0.10 0.50 1.00 3.00 5.00 10.00 และ 15.00 กรัมต่อลิตร น้ำส่าที่ใช้เมื่อผสมกับแบคที่เรียน้ำส้มแล้วมีปริมาณแอลกอฮอล์เริ่มต้นร้อยละ 13 (w/v) โดยมีตัวควบคุมคือน้ำส่าที่ไม่มีการเติม $NH_4H_2PO_4$ ผลการทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 3.9

ตารางที่ 3.9 ผลของสารเสริม $NH_4H_2PO_4$ ปริมาณต่างๆ ที่มีต่อการผลิตกรดน้ำส้มของแบคทีเรียน้ำส้ม เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดที่ระยะเวลาการหมัก 7 วัน

ปริมาณ $NH_4H_2PO_4$ ที่เติมในน้ำส่า (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดน้ำส้มที่ผลิต (ร้อยละ)
0 (control)	2.5
0.03	2.5
0.05	2.5
0.10	2.5
0.50	2.6
1.00	2.7
3.00	3.7
5.00	3.7
10.00	6.0
15.00	6.1

จากตารางนี้จะเห็นได้ว่าการเติมสารเสริม $NH_4H_2PO_4$ ลงในน้ำส่ามีผลต่อการผลิตกรดน้ำส้มของแบคทีเรีย เมื่อเทียบกับตัวควบคุม (control) ซึ่งเป็นน้ำส่าที่ไม่มีการเติมสารเสริมการเจริญเติบโต โดยที่ปริมาณของสารเสริมที่เติม 10 กรัมต่อลิตร จะได้ปริมาณกรดสูงถึงร้อยละ 6 แต่เมื่อเพิ่มขึ้นไปเป็น 15 กรัมต่อลิตร การผลิตกรดก็ไม่ได้เพิ่มมากขึ้น ดังนั้นในกระบวนการหมักต่อไป การใช้สารเสริมในปริมาณร้อยละ 10 กรัมต่อลิตร ก็เพียงพอสำหรับการกระตุ้นการผลิตกรดน้ำส้มของแบคทีเรียน้ำส้ม

3.3 การเก็บเกี่ยวและการเปรียบเทียบคุณลักษณะทางกายภาพของน้ำส้มสายชูที่หมักได้จากข้าวแต่ละชนิด

จากผลการทดลองที่ได้ทั้งหมดจากตารางที่3.1 – 3.9 ได้นำมาใช้ในการหมักน้ำส้มสายชูจากน้ำส่าที่หมักจากข้าวทั้ง 3 ชนิดคือ ข้าวจ้าว ข้าวเหนียว และข้าวกล้อง โดยสภาวะที่ใช้คือใช้ inoculum size ร้อยละ 30 ซึ่งให้ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์เมื่อเริ่มการหมักประมาณร้อยละ 13 เติมสารเสริมการเจริญ $NH_4H_2PO_4$ 10 กรัมต่อลิตร ให้อากาศแบบมากเกินพอนานเป็นเวลา 10 วัน จากนั้นหยุดให้อากาศปล่อยให้เกิดการตกตะกอน เมื่อใสแล้วจึงเติมสารเคมีเพื่อทำลายจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อน จากนั้นนำไปบรรจุในขวดแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จะได้เป็นผลิตภัณฑ์น้ำส้มสายชูหมักจากข้าวทั้ง 3 ชนิด จากภาพจะเห็นได้ว่าน้ำส้มสายชูที่หมักจากข้าวกล้องจะมีสีที่เข้มกว่าน้ำส้มสายชูที่หมัก

จากข้าวจ้าว และข้าวเหนียว แต่น้ำส้มสายชูทั้ง 3 ชนิดจะมีกลิ่นหอมของการหมัก ไม่แสบจมูก ซึ่งจะเป็นกลิ่นที่ต่างไปจากน้ำส้มสายชูกลั่นทั่วไป

รูปที่ 3.2 เปรียบเทียบสีของน้ำส้มสายชูที่หมักได้จากข้าวจ้าว ข้าวกล้อง และข้าวเหนียว

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

กรรมวิธีการหมักน้ำส้มสายชูจากข้าวจ้าว ข้าวเหนียว และข้าวกล้อง สามารถสรุปได้ดังนี้คือ นำปลายข้าวแช่น้ำนาน 5-10 นาที ใช้อัตราส่วนของข้าวต่อน้ำ 1 ส่วนต่อ 1.5 ส่วน โดยปริมาตร จากนั้นกรองน้ำออก แล้วนึ่งในไอน้ำเดือด นานประมาณ 30 นาที จะทำให้ข้าวสุกพอดี ไม่เป็นไตแข็ง และ ไม่แฉะ ถ้าใช้ข้าวเต็มเมล็ดจะทำให้ระยะเวลาในการแช่น้ำนานประมาณ 6 ชั่วโมง และนึ่งนาน 30 นาที จากนั้นนำไปล้างเมือกอออก ผึ่งทิ้งไว้ให้เย็น นำมาผสมกับลูกแป้งส่าเหล้าที่บดพอละเอียดใน อัตราส่วน ผงลูกแป้ง 7 กรัมน้ำหนักแห้ง ต่อข้าวที่นึ่งแล้ว 1 กิโลกรัม บรรจุลงในโหลแก้วปากเปิดโดย การวางเรียงสลับกันเป็นชั้นของข้าวนึ่ง และลูกแป้งที่บดพอละเอียด แล้วปิดปากโหลด้วยผ้าขาวบาง หลายๆชั้น ตั้งไว้นานประมาณ 3 วันจนสังกตเห็นน้ำต้อย จึงทำการผ่าน้ำด้วยน้ำเชื่อมที่มีความหวาน ประมาณ 12-14 $^{\circ}$ Brix ปล่อยให้หมักนาน 3 สัปดาห์ ถึง 1 เดือน จะได้น้ำส่าที่มีแอลกอฮอล์ร้อยละ 15-17 (v/v) เมื่อวัดด้วย Portable Refractometer RHW-25 แต่ถ้าเป็นข้าวกล้องต้องใช้เวลาในการหมักนาน กว่านี้จึงจะได้แอลกอฮอล์ในปริมาณดังกล่าว และการหมักจากข้าวกล้องจะได้ปริมาณน้ำส่าที่น้อยกว่า ส่วนในขั้นตอนการผลิตกรดน้ำส้มโดยแบคทีเรียน้ำส้มนั้นทำในถังกลมทรงสูงที่มีการเป่าอากาศแบบ มากเกินพอตลอดเวลา ถ้าใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (innoculum size) ร้อยละ30 (v/v) ซึ่งจะทำให้มีปริมาณ แอล กอฮอล์เริ่มต้นในน้ำส่าประมาณร้อยละ 13 (w/v)และ เติมสารเสริมการเจริญเติบโตในรูปของเกลือ ฟอสเฟต เช่น $NH_4H_2PO_4$ หรือ KH_2PO_4 ในปริมาณ 10 กรัมต่อลิตร จะได้กรดน้ำส้มในสารละลาย ประมาณร้อยละ 6 (w/v) ภายในระยะเวลา 10 วัน เมื่อนำไปกรอง และฆ่าเชื้อแล้วจะได้น้ำส้มสายชูที่ หมักจากข้าวเหนียว และข้าวจ้าวจะมีลักษณะใส สีเหลืองทอง แต่น้ำส้มสายชูที่หมักจากข้าวกล้องจะมี สีน้ำตาล

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

เอกสารอ้างอิง

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, กระทรวงอุตสาหกรรม

2537 มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม น้ำส้มสายชู, ประกาศในราชกิจจานุเบกษา ฉบับพิเศษ เล่ม 101 ตอนที่ 33, 15 มีนาคม 2527

อนุรักษ์ ขจรบุญ ศิริรักษ์ ทับพุ่ม และนันทนิตย์ คงวัน

2539 การผลิตและเปรียบเทียบคุณภาพน้ำส้มสายชูหมักจากน้ำสับปะรดและข้าวเหนียว, โครงการพิเศษหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยรังสิต

สราวุธ อยู่สบาย และนันทนิตย์ คงวัน

2540 การผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากน้ำที่บีบจากเปลือกสับปะรด โดยใช้ระบบแบบตรึงฟิล์ม,โครงการพิเศษหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีอาหาร กลุ่มคณะวิศวกรรมศาสตร์ และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยรังสิต

จิรวุธ รัตนโอภาส ธงชัย พัฒนวรพันธุ์ และนันทนิตย์ คงวัน

2541 การศึกษาหาอัตราการป้อนน้ำหมักที่เหมาะสมในการผลิตกรดน้ำส้มด้วยระบบแบบ Fixed Bed Reactor , โครงการพิเศษหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาอุตสาหกรรมเกษตร กลุ่มคณะวิศวกรรมศาสตร์ และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยรังสิต

จักรกริศน์ พิมพ์ปรุ และคณะ

2543 การศึกษาหัวเชื้อข้าวหมาก (Starter for fermented rice), วิทยานิพนธ์ปริญญาตรี ภาควิชาวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีการอาหาร

แสงไทย เค้าภูไทย

2545 หนังสือขุมทองเหล้าไทย ไวน์ผลไม้, พิมพ์ครั้งที่ 1 กรุงเทพ: อินฟอร์มีเดีย บุ๊คส์ มาลัย บุญรัตนกรกิจ

2547 Vinegar Production, เอกสารประกอบการอบรม จัดโดยสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 24 มีนาคม 2547

Adam M.R.

1985 Vinegar, Microbiology of Fermented Food. vol 1. London : Elsevier Science

Kumiko Nanda, Mariko Taniguchi, Satoshi Ujeke, Nobuhiro Ishihara, Hirotaka Mori, Hisayo Ono, and Yashikatsu Murooka

2001 Characterization of Acetic Acid Bacteria in Traditional Acetic Acid Fermentation

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

of Rice Vinegar (Komesu) and Unpolished Rice Vinegar (Kurosu) Produced in Japan. Applied and Environment Microbiology v.67(2) Copyright by American Society for Microbiology
Available at http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi.artid=92679; 31/1/2007

San Chiang Tan
2005 vinegar fermentation by submerge process and generator, A Thesis Submitted to the Graduate Faculty of Louisiana State University Agricultural and Mechanical Collage in Partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science in The Department of Food Science in the Department of Food Science Mechanical Engineering, University of Louisiana.
Available at http://etd.Isn.edu/cocs/available/etd-11092005-452334/unrestricted/ Thesis.pdf; 32/1/2007

Fragapane Giuseppe, Rubio-Fernandez Hipotito and Desamparados Salvador Maria
2006 continuuous production of wine vinegar in bubble colume reactors of up to 60L capacity, European Food Researchand Technology.
Available at http://cat.insitfr/a Modele=affichen&cpsidt=14586208 : 31/1/2007

G.S. Kocher, K.L. Kalra and R.P. Phutela
2006 Comparative Production of Sugarcane Vinegar by Different Immobilization Techniques, J. Inst. Brew. 112(3), 264-266
Available at http://www.scientificsocieties.org/JIB/papers/2006/G-2006-1023-464.pdf

http://www.isan.clubs.chula.ac.th.ตัวอย่างสูตรลูกแป้ง, เว็บบอร์ดชมรมศิลปวัฒนธรรมอีสน จุฬาฯ 8/9/49

http://www.dss.go.th/dssweb/st-articles/files/bsp-3-2545-brown-rice.pdf.ข้าวกล้องที่มากด้วยคุณค่า ผู้เรียบเรียงนว.7ศิริบุญ พูลสวัสดิ์ กองวิทยาศาสตรชีวภาพ 8/9/49

http://www.doa..go.th. มาตรฐานข้าวไทย 6/10/49

http://www.diw.go.th. จุลชีววิทยาของสาโทและกระบวนการผลิตสาโท 22/11/49

http://www. Ricethailand.org/tech. โครงสร้างของเมล็ดข้าว 6/10/49

http://www. Vinegarman.com. The Vinegar Bacteria. 14/12/49

http://www. Kanchanapisek.or.th/kp1/ data/03/lab1r1.htm. 20/12/49

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก. การวิเคราะห์กรดน้ำส้ม (กรดอะซีติค) (มอก. 83-2527 หน้า 15-16)

สารละลายที่ใช้

5.1.1 สารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 โมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร

5.1.2 สารละลายฟีนอล์ฟทาลีนอินดิเคเตอร์

วิธีวิเคราะห์

ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างมา 2 ลูกบาศก์เซนติเมตร เติมน้ำกลั่นซึ่งต้มเดือดและทำให้เย็นแล้วใหม่ๆลงไปจนกระทั่งสีของสารละลายจางลงแล้วไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยใช้ฟีนอล์ฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ จุดสิ้นสุดเป็นสีชมพู จดปริมาตรสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้

วิธีคำนวณ

คำนวณหากรดอะซีติคเป็นกรัม ต่อ 100 ลูกบาศก์เซนติเมตรจากสูตรดังนี้

$$\text{กรดอะซีติค (กรัมต่อ100 ลูกบาศก์เซนติเมตร)} = \frac{V \times N \times 60 \times 100}{2 \times 1000}$$

เมื่อ V คือ ปริมาตรสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไตเตรท เป็นลูกบาศก์เซนติเมตร

N คือ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ เป็นโมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร

ภาคผนวก ข. การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งทั้งหมด (มอก. 83-2527 หน้า 16-17)

เครื่องมือประกอบด้วย

จานระเหย (evaporating dish) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร

1. เครื่องอังน้ำ
2. ตู้อบ (oven)
3. เดสิกเกเตอร์ (desicator)
4. เครื่องชั่งอย่างละเอียด (analytical balance)

วิธีวิเคราะห์ ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างมา 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร ใส่ลงในจานระเหยที่ทราบน้ำหนักแน่นอนแล้ววางบนเครื่องอังน้ำจนตัวอย่างแห้ง แล้วนำไปใส่ในตู้อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสนาน 2 ชั่วโมงครึ่ง ทิ้งไว้ให้เย็นในเดสิกเกเตอร์แล้วชั่งอีกครั้ง

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

วิธีคำนวณ

คำนวณหาของแข็งทั้งหมด เป็นร้อยละจากสูตรดังนี้

$$\text{ของแข็งทั้งหมด} = \frac{W_1 - W_2}{10} \times 100$$

เมื่อ W_2 คือ น้ำหนักจานระเหยพร้อมตัวอย่างหลังจากอบแล้ว เป็นกรัม

W_1 คือ น้ำหนักจานระเหยก่อนใส่ตัวอย่าง เป็นกรัม

ภาคผนวก ค. การวิเคราะห์กรดแร่อิสระ(มอก. 83-2527 หน้า 17)

สารละลายที่ใช้

สารละลายเมทิลไวโอเลตในน้ำ 0.01 กรัมต่อ 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร

วิธีวิเคราะห์

ตวงตัวอย่าง 5 ลูกบาศก์เซนติเมตร เติมสารละลายเมทิลไวโอเลต 2 ถึง 3 หยด ผสมให้เข้ากัน ถ้าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเขียวหรือสีน้ำเงิน แสดงว่ามีกรดแร่อิสระ

ภาคผนวก ง. การวิเคราะห์สีของน้ำตาลเคี่ยวไหม้ โดยวิธีมาเทอร์ส (Mayhers test) (มอก. 83-2527 หน้า 13-15)

เครื่องมือประกอบด้วย

1. หลอดหมุนเหวี่ยง (centrifugal tube) ขนาด 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร
2. เครื่องหมุนเหวี่ยง

สารละลายที่ใช้และวิธีเตรียม

1. สารละลายเปกติน (pectin solution)
   ละลายเปกติน 1 กรัมในน้ำ 75 ลูกบาศก์เซนติเมตร เติมเมทธานอล 25 ลูกบาศก์เซนติเมตรเพื่อกันเสีย
2. สารละลาย 2,4 ไดไนโตรฟีนิลไฮดราซีน (2,4-dinitrophenylhydrazine)
   ละลาย 2,4 ไดไนโตรฟีนิลไฮดราซีน 1 กรัมในกรดซัลฟูริคเข้มข้น (ความหนาแน่นสัมพัทธ์ 1.84) 7.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร (ถ้าเก็บไว้ในขวดแก้วที่มีจุกปิดสนิท จะเก็บไว้ได้เป็นเวลา 2 ถึง 3 เดือน)

วิธีวิเคราะห์

1. ตวงตัวอย่างที่กรองแล้ว 50 ถึง 60 ลูกบาศก์เซนติเมตร (ปริมาตรที่ใช้ขึ้นกับความเข้ม ของสีตัวอย่าง) นำไปตั้งบนเครื่องอังน้ำจนเหลือปริมาตร 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้วใส่ใน

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

หลอดหมุนเหวี่ยง เติมสารละลายเปกติน 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ผสมให้เข้ากัน เติมกรดไฮโดรคลอริคเข้มข้น (ความหนาแน่นสัมพัทธ์ 1.16) 2 ถึง 3 หยด และ
เอทธานอล ลงในหลอดหมุนเหวี่ยงพอประมาณ เขย่าให้เข้ากันนำไปหมุนเหวี่ยงนาน 5 ถึง 10 นาที แล้วรินส่วนที่เป็นน้ำ ทิ้งไป

2. นำตะกอนที่ได้จากข้อ 1 ไปละลายในน้ำ 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร เติมกรดไฮโดรคลอริคเข้มข้น และเอทธานอลเช่นเดียวกับข้อ 1 เขย่าให้เข้ากัน นำไปหมุนเหวี่ยง แล้วริน ส่วนที่เป็นน้ำทิ้ง
3. นำตะกอนที่ได้จากข้อ 2 มาทำตามวิธีเดียวกับข้อ 2 หลายๆครั้ง จนกระทั่งชั้นเอทธานอลใสและไม่มีสี รินส่วนที่เป็นน้ำทิ้ง ละลายตะกอนที่เป็นวุ้นในน้ำร้อน 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร ถ้าส่วนที่เป็นน้ำใสไม่มีสี แสดงว่าไม่มีน้ำตาลเคี่ยวไหม้ ถ้าส่วนที่เป็นน้ำใสมีสีน้ำตาลแสดงว่ามีน้ำตาลเคี่ยวไหม้ เพื่อความแน่นอนให้ทดสอบต่อไปตามข้อ 4
4. แยกส่วนที่เป็นน้ำใสที่มีสีน้ำตาลออกมาเติมสารละลาย 2,4 ไดไนโตรฟีนิลไฮดราซีน 1 ลูกบาศก์เซนติเมตรลงไป ผสมให้เข้ากันดี ตั้งบนเครื่องอังน้ำนาน 30 นาที ถ้ามีตะกอนเกิดขึ้นแสดงว่ามีน้ำตาลเคี่ยวไหม้

ภาคผนวก จ. การวัดปริมาณเอทธิลแอลกอฮอล์

ใช้ Portable Refractometer RHW-25 โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ข้อมูลนักวิจัย

คำนำหน้า	นาง
ตำแหน่งทางวิชาการ	ผศ.
ชื่อผู้วิจัย	นันทนิตย์
นามสกุลผู้วิจัย	คงวัน
ชื่อภาษาอังกฤษ	Nuntanit
นามสกุลภาษาอังกฤษ	Kongwan
ที่อยู่(บ้าน)	100/257 หมู่บ้านพฤกษาวิลล์ 2 ถนน นาวงประชาพัฒนา ต. หลักหก อ. เมือง
จังหวัด(บ้าน)	ปทุมธานี
รหัสไปรษณีย์(บ้าน)	12000
โทรศัพท์(บ้าน)	02-9786149
ที่อยู่(ที่ทำงาน)	สาขาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยรังสิต ต. หลักหก อ.เมือง
จังหวัด(ที่ทำงาน)	ปทุมธานี
รหัสไปรษณีย์(ที่ทำงาน)	12000
โทรศัพท์(ที่ทำงาน)	02-9972222 ต่อ 1596
แฟกซ์(ที่ทำงาน)	02-9972222 ต่อ 3661
E-Mail Address	NUN 1206@yahoo.co.th
ระดับการศึกษา	ปริญญาโท วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้า ธนบุรี

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University