การศึกษากระบวนการหมักที่เหมาะสมและผลของการพาสเจอร์ไรซ์ต่อองค์ประกอบทางเคมีและคุณภาพด้านจุลินทรีย์ของสาโทที่ผลิตจากข้าวเหนียวดำ

The Study of Fermentation and the Effect of the Pasteurization on Chemical Compositions and Microbial Quality of Rice Wine Brewed from Black Sticky Rice

สัญชัย ยอดมณี*[1] และ ปรวัล นาคแสง[2]

Sanchai Yotmanee*[1] & Porawan Naksang[2]

[1]สาขาวิชาคหกรรมศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏภูเก็ต

[2]สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะเทคโนโลยีคหกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ

[1]Home Economics Program, Faculty of Science and Technology, Phuket Rajabhat University

[2]Department of food Science and Technology, Faculty of Home Economics Technology, Rajamangala University of Technology Krungthep

Submitted 23/9/2020 ; Revised 2/11/2020 ; Accepted 17/11/2020

บทคัดย่อ

สาโทข้าวเหนียวดำ (black rice wine, BRW) เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีสีคล้ายไวน์โรเซ่เนื่องจากมีองค์ประกอบของสารแอนโธไซยานินส์เป็นองค์ประกอบหลัก การผลิตสาโทนิยมใช้โพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟท์ เพื่อทำลายจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิต แต่วิธีการดังกล่าวจะส่งผลเสียต่อผู้บริโภคที่แพ้กำมะถัน ดังนั้นงานวิจัยเรื่องนี้จึงนำการพาสเจอร์ไรซ์มาใช้ในการผลิตสาโทข้าวเหนียวดำ และศึกษาการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบทางเคมีและคุณภาพด้านจุลินทรีย์ที่อาจจะเกิดขึ้นเนื่องจากกระบวนการดังกล่าว การผลิต BRW ในงานวิจัยครั้งนี้เริ่มด้วยการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาล (saccharification) ด้วย *Aspergillus oryzae* ATCC 22787 ที่ 30°C นาน 2 วัน จากนั้นหมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 478 ที่ 25°C นาน 6 วัน และพาสเจอร์ไรซ์ที่ 70°C นาน 15 นาที จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของ BRW พบว่า กรดอินทรีย์ที่ระเหยได้ (กรดโพรพิโอนิกและกรดอะซิติก) น้ำตาลมอลโทส และไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ ใน BRW ที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์มีค่าลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับ BRW ที่ไม่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ในขณะที่ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเพิ่มขึ้น ปริมาณแอลกอฮอล์ใน BRW ที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์ไม่มีความแตกต่างกับ BRW ที่ไม่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\geq0.05$) นอกจากนี้การพาสเจอร์ไรซ์สามารถทำลายจุลินทรีย์ทั้งหมดใน BRW ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ: พาสเจอร์ไรซ์ สาโท ข้าวเหนียวดำ

***ผู้ประสานงานหลัก (Corresponding Author)**

E-mail: sanchai.y@pkru.ac.th

Abstract

Black rice wine (BRW) is a product that has a similar color to rosé wine due to the containing of anthocyanins. The brewing of BRW likely uses potassium metabisulfite (KMS) for disinfectant agent. However, this process has disadvantage for consumers who have sulfur allergy. Therefore, this research studied the application of the pasteurization instead of the using of KMS for fermentation cessation. The BRW samples were analyzed for the chemical compositions and microbial quality. The BRW brewing was started at the saccharification using *Aspergillus oryzae* ATCC 22787 at 30°C for 2 days, and then followed by the fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 478 at 25°C for 6 days. The BRW was pasteurized at 70°C for 15 min. After that, they were analyzed for chemical compositions. The results showed that volatile organic acids (propionic acid and acetic acid), maltose and cyanidin 3-glucoside in pasteurized BRW were significantly decreased ($p<0.05$) comparing to non-pasteurization BRW. However, glucose was increased and the alcohol in pasteurized BRW was not significantly different ($p\geq0.05$) with non-pasteurization BRW. Furthermore, the study of microbial quality showed that the pasteurization stopped the growth of microorganisms in BRW.

Keyword: Pasteurization, Rice wine, Black sticky rice

บทนำ

สาโทจากข้าวเหนียวดำเป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์พื้นบ้านที่มีสีชมพูอมแดงคล้ายสีของไวน์โรเซ่ (rosé wine) เนื่องจากมีแอนโธไซยานินส์ [1] ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ถูกสกัดออกมาจากเยื่อหุ้มเมล็ดของข้าวเหนียวดำระหว่างการหมัก จากการศึกษาพบว่าไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ เป็นแอนโธไซยานินส์ที่พบมากที่สุดในข้าวเหนียวดำ โดยมีอยู่ประมาณ 94 mg/100 g [2] นอกจากนี้แอนโธไซยานินส์ยังเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีผลในการป้องกันการเสื่อมของร่างกายเนื่องจากการเกิดอนุมูลอิสระระดับเซลล์ [3]

กระบวนการผลิตสาโทจะแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน [4] คือ (1) การเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาล ด้วยเชื้อรา เช่น *Rhizopus* sp., *Mucor* sp., *Amylomyces* sp. และ *Aspergillus* sp. ในระหว่างการบ่มเชื้อราจะสร้างเส้นใยจำนวนมากและแทงทะลุเข้าไปในเมล็ดข้าว เชื้อราจะสร้างเอนไซม์อะไมเลส ออกมาย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลที่เกิดจากกระบวนการหมัก (น้ำตาลมอลโตไตรโอส น้ำตาลมอลโตส และน้ำตาลกลูโคส) กรดอินทรีย์และวิตามินที่เป็นประโยชน์ต่อการเจริญของยีสต์ (2) ขั้นตอนการหมักน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์โดยเชื้อยีสต์ เช่น *Saccharomyces cerevisiae, S. cerevisiae* var. *diastaticus, Hensenula* sp. และ *Torulopsis* sp. ในระหว่างการหมัก ยีสต์จะเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ คาร์บอนไดออกไซด์ และกรดอินทรีย์ต่าง ๆ เช่น กรดมาลิก กรดแลกติก และกรดอะซิติก [5]

หลังจากเสร็จสิ้นกระบวนการหมัก จะมีการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ในสาโท เพื่อรักษาคุณภาพและยืดอายุการเก็บรักษา โดยนิยมใช้สารโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟท์ (KMS) ที่ความเข้มข้น 200 mg/l [6] แต่ผู้ผลิตบางรายใส่ KMS ในปริมาณมาก ซึ่งอาจจะก่อให้เกิดอาการแพ้กำมะถันอย่างรุนแรงในผู้บริโภคบางราย โดยข้อมูลทางสถิติของผู้แพ้กำมะถันในประเทศไทยยังไม่มีการรายงานอย่างชัดเจน แต่มีการศึกษาในประเทศเดนมาร์กพบว่ามีผู้แพ้กำมะถันในไวน์แดงร้อยละ 8 จากประชากรที่ศึกษาทั้งสิ้น 4,142 คน [7] ดังนั้นการใช้ความร้อนในระดับการพาสเจอร์ไรซ์ที่ 72°C นาน 15 นาที [5] จึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่น่าสนใจ ซึ่งข้อดีของการพาสเจอร์ไรซ์นอกจากจะทำลายจุลินทรีย์ในสาโทแล้ว ยังสามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาที่เป็นสาเหตุทำให้สาโทเสื่อมเสียจากเอนไซม์ได้อีกด้วย

ดังนั้น เพื่อเป็นการควบคุมคุณภาพทางเคมีและจุลินทรีย์ของสาโทจากข้าวเหนียวดำ งานวิจัยเรื่องนี้จึงศึกษากระบวนการหมักและผลของการใช้ความร้อนระดับพาสเจอไรซ์ต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณแอลกอฮอล์ น้ำตาล กรดอินทรีย์ ไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ และปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในสาโทจากข้าวเหนียวดำ

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษากระบวนการหมักและผลของกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ต่อปริมาณของแอลกอฮอล์ น้ำตาล กรดอินทรีย์ ไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ และปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในสาโทที่ผลิตจากข้าวเหนียวดำ

วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการผลิตสาโทจากข้าวเหนียวดำ

ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการผลิตสาโทจากข้าวเหนียวดำมีกระบวนการดังนี้

กระบวนการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาล (saccharification)

วิธีการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาล ในการวิจัยครั้งนี้ดัดแปลงจากวิธีการของอรอง [8] โดยนำข้าวเหนียวดำไปนึ่งที่อุณหภูมิ 100°C นาน 60 นาที จากนั้นนำไปผสมด้วย *A. oryzae* ATCC 22787 ที่ความเข้มข้น $3x10^6$ spores/ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 และ 30°C ตัวอย่างจะถูกนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลและกรดอินทรีย์ทุกวัน เป็นเวลา 8 วัน เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาล

กระบวนหมัก (fermentation)

วิธีการหมักสาโทในการวิจัยครั้งนี้ดัดแปลงจากวิธีการของอรอง [8] เริ่มจากการนำข้าวเหนียวดำไปผ่านกระบวนการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาล โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองกระบวนการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาล หลังจากนั้นนำไปผสมด้วย *S. cerevisiae* NCYC 478 ที่ความเข้มข้น 6x10^6 cells/ml หมักที่อุณหภูมิ 25 และ 30°C ตัวอย่างจะถูกนำไปปั่นแยกส่วนด้วย Heraeus Multifuge 3SR+ (Thermo Scientific, UK) ที่ 7,300 g นาน 15 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณแอลกอฮอล์ น้ำตาล และกรดอินทรีย์ทุกวัน เป็นเวลา 8 วัน เพื่อหาสภาวะของการหมักที่เหมาะสมต่อไป

การศึกษาผลของกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ที่มีต่อคุณภาพของสาโทจากข้าวเหนียวดำ

นำข้าวเหนียวดำไปผลิตเป็นสาโทโดยใช้กระบวนการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาล และกระบวนการหมักที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการผลิตสาโทจากข้าวเหนียวดำ จากนั้นนำสาโทไปผ่านกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ในขวดที่ปิดสนิท เพื่อป้องกันการระเหยของแอลกอฮอล์และกลิ่นของสาโทที่ 70°C นาน 15 นาที โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Techakanon และ Sirimuangmoon [9] ตัวอย่างของสาโทจะนำไปวิเคราะห์หาปริมาณแอลกอฮอล์ น้ำตาล กรดอินทรีย์ ไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ และการวิเคราะห์จุลินทรีย์ทั้งหมด และนำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับตัวอย่างสาโทที่ไม่ผ่านกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ ดังนี้

การหาปริมาณแอลกอฮอล์ น้ำตาล และกรดอินทรีย์

วิธีวิเคราะห์ดัดแปลงจากวิธีการของ Zappa และคณะ [10] โดยการนำตัวอย่างสาโทไปกรองด้วย syringe filter ขนาด 0.22 µm (Minisart®, Sartorius, Germany) จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC) (Agilent, Germany) โดยฉีดตัวอย่างสาโทปริมาตร 50 µl ลงในเครื่อง HPLC โดยใช้กรดซัลฟูริกเข้มข้น 5 mM เป็น mobile phase กำหนดอัตราการไหลที่ 0.6 ml/min สารประกอบในสาโทจะถูกแยกด้วย Aminex HPX-87H column (300 mm x 7.8 mm, 9 µm particle size) (Bio-Rad, UK) และจะถูกตรวจวัดโดยใช้ detector จำนวน 2 ชนิด คือ diode array detector (DAD) ที่ความยาวคลื่น 210 nm สำหรับการวิเคราะห์กรดอินทรีย์ และ reflective index (RI) สำหรับการวิเคราะห์น้ำตาลและแอลกอฮอล์ ในการวิเคราะห์ครั้งนี้จะคำนวณปริมาณของแอลกอฮอล์ น้ำตาล และกรดอินทรีย์โดยการเทียบกับกราฟสารละลายมาตรฐานของน้ำตาล คือ น้ำตาลมอลโตไตรโอส น้ำตาลมอลโตส และน้ำตาลกลูโคส ในช่วง 10-100 mg/l สารละลายมาตรฐานของกรดอินทรีย์ คือ กรดซิตริก กรดทาร์ทาริก กรดมาลิก กรดซัคซินิก กรดแลกติก กรดอะซิติก และกรดโพรพิโอนิก ในช่วง 10-100 mg/l และสารละลายมาตรฐานแอลกอฮอล์ ในช่วง 0.1-10 ml/l โดยกำหนดให้ค่าสัมประสิทธิ์การกำหนด (R^2) ของกราฟมาตรฐานไม่ต่ำกว่า 0.99

การหาปริมาณไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์

ตัวอย่างสาโทจะถูกวิเคราะห์ไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ ตามวิธีการของ Seal [11] โดยฉีดสาโทที่ผ่านการกรองด้วย syringe filter ปริมาตร 5 µl ลงในเครื่อง HPLC โดยใช้กรดฟอมิกเข้มข้น 0.1% (ตัวทำละลาย A) และเมทานอล (ตัวทำละลาย B) เป็น mobile phase ซึ่งอัตราการไหลกำหนดที่ 0.8 ml/min โดยรูปแบบ gradient ของ mobile phase คือ 10% B ที่ 13 นาที; 25% B ที่ 25 นาที; 35% B ที่ 30 นาที; 20% B ที่ 32 นาที; 15% B ที่ 35 นาที; 10% B ที่ 40 นาที; 5% B ที่ 50 นาที และคงที่ที่สภาวะนี้นาน 10 นาที สารประกอบฟีนอลิกและแอนโธไซยานินส์ในสาโทจะถูกแยกด้วยการใช้ Nova-Pak® C-18 column (250 mm x 4.6 mm, 4 µm particle size) (Water, UK) และจะถูกตรวจวัดสัญญาณโดยใช้ DAD

ที่ความยาวคลื่น 520 nm การคำนวณปริมาณไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ ทำโดยการเทียบกับกราฟสารละลายมาตรฐานในช่วง 50-500 mg/l โดยกำหนดให้ค่าสัมประสิทธิ์การกำหนดของกราฟมาตรฐานไม่ต่ำกว่า 0.99

การวิเคราะห์จุลินทรีย์ทั้งหมด

ปิเปตสาโทข้าวเหนียวดำ (ไม่เจือจาง) และตัวอย่างสาโทข้าวเหนียวดำที่เจือจางด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ระดับความเจือจาง 1:10, 1:100 และ 1:1,000 ระดับละ 1 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ plate count agar (PCA) จากนั้นใช้เทคนิค spread plate โดยเกลี่ยตัวอย่างสาโทลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อจนแห้งสนิท นำไปบ่มเพาะเชื้อที่ 35±1°C นาน 48±3 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีบนจานเพาะเชื้อ คำนวณและรายงานผลจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดเป็น CFU/ml [12]

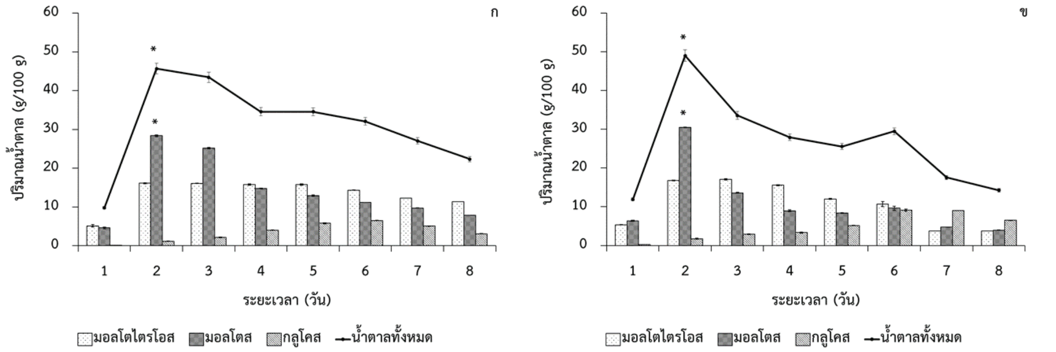
การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ในการทดลองครั้งนี้มีการวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) และเก็บข้อมูลอย่างน้อย 3 ซ้ำต่อการทดลอง โดยผลการทดลองที่ได้จะนำไปวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยวิธี ANOVA จากนั้นจะนำไปวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยที่ผลการทดลองการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการผลิตสาโทจากข้าวเหนียวดำวิเคราะห์ด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (MRT) และผลการทดลองที่ได้จากการศึกษากระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ที่มีต่อคุณภาพของสาโทจากข้าวเหนียวดำจะถูกนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี t-test ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistic for Windows, version 22.0 (IBM, USA)

ผลการวิจัย

ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการผลิตสาโทจากข้าวเหนียวดำ

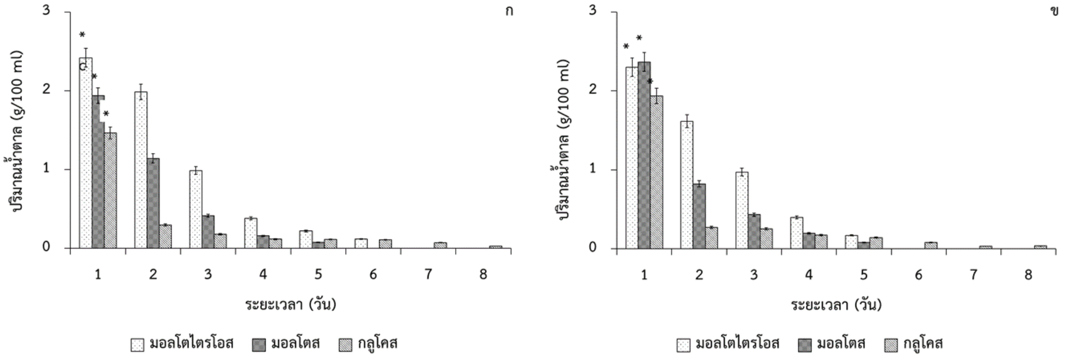
การศึกษาการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลด้วย *A. oryzae* ATCC 22787 พบว่าเชื้อราสามารถย่อยแป้งในข้าวเหนียวดำให้เป็นน้ำตาลมอลโตไตรโอส น้ำตาลมอลโตส และน้ำตาลกลูโคส โดยปริมาณน้ำตาลมอลโตสและน้ำตาลทั้งหมดในข้าวเหนียวดำที่ผ่านการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลที่อุณหภูมิ 25°C และ 30°C จะมีความคล้ายคลึงกัน กล่าวคือ จะมีปริมาณสูงที่สุดในวันที่ 2 และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับวันอื่น ๆ ที่บ่มในสภาวะเดียวกัน และปริมาณน้ำตาลมีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาของการบ่มอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 1) นอกจากนี้ยังพบว่าการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลด้วยเชื้อราที่อุณหภูมิสูงกว่าจะได้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดสูงกว่า ดังนั้นสภาวะของการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลที่เหมาะสมของการวิจัยครั้งนี้คือที่อุณหภูมิ 30°C เวลา 2 วัน



ภาพที่ 1 ปริมาณน้ำตาลในข้าวเหนียวดำที่ผ่านกระบวนการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลด้วย *A. oryzae* ATCC 22787 ที่อุณหภูมิ 25°C (ก) และ 30°C (ข)

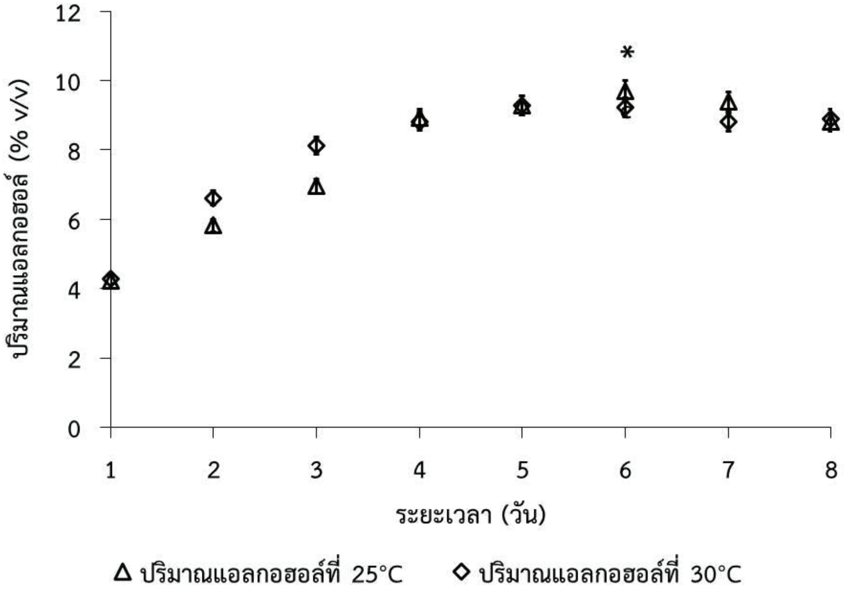
* คือ ผลการทดลองที่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p<0.05$)

จากการศึกษาการหมักสาโทข้าวเหนียวดำด้วย *S. cerevisiae* NCYC 478 ที่อุณหภูมิ 25°C และ 30°C พบว่าปริมาณน้ำตาลมอลโตไตรโอส น้ำตาลมอลโตส และน้ำตาลกลูโคสในวันที่ 1 มีค่าสูงกว่าวันอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบที่สภาวะการหมักเดียวกัน เนื่องจากเชื้อยีสต์อยู่ระหว่างการปรับตัวจึงมีการใช้น้ำตาลน้อยกว่าวันอื่น ๆ หลังจากนั้นปริมาณน้ำตาลจะมีค่าลดลง (ภาพที่ 2) เนื่องจากน้ำตาลได้ถูกเปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์โดยกระบวนการเมทาบอลิซึมของยีสต์ [13] นอกจากนี้ยังพบว่าการหมักสาโทข้าวเหนียวดำที่อุณหภูมิ 25°C จะให้ปริมาณแอลกอฮอล์สูงสุดและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับการหมักที่อุณหภูมิ 30°C ($p<0.05$) ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 2 ปริมาณน้ำตาลในสาโทข้าวเหนียวดำที่ผ่านการหมักด้วย *S. cerevisiae* NCYC 478 ที่อุณหภูมิ 25°C (ก) และ 30°C (ข)

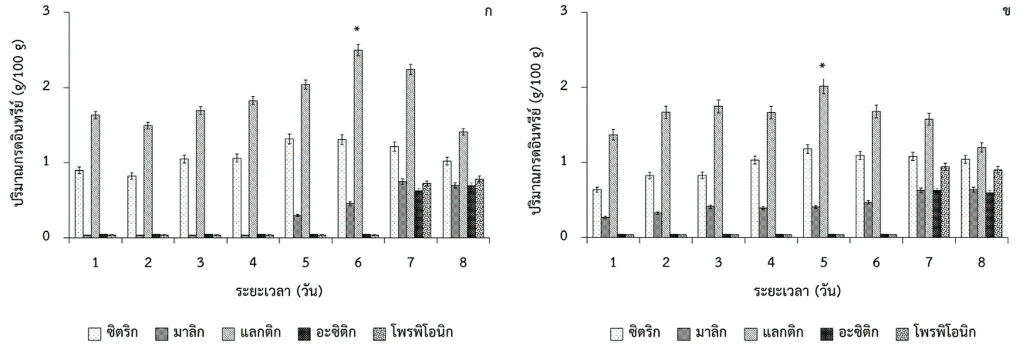
* คือ ผลการทดลองที่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p<0.05$)



ภาพที่ 3 ปริมาณแอลกอฮอล์ในสาโทข้าวเหนียวดำที่ผ่านการหมักด้วย *S. cerevisiae* NCYC 478 ที่อุณหภูมิ 25°C (ก) และ 30°C (ข)
* คือ ผลการทดลองที่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p<0.05$)

จากการศึกษากระบวนการเมทาบอลิซึมของยีสต์ในการสร้างกรดอินทรีย์พบว่า กรดซิตริก กรดมาลิก กรดแลกติก และกรดโพรพิโอนิก จะถูกสร้างขึ้นระหว่างการหมักสาโทข้าวเหนียวดำ จากนั้นปริมาณของกรดอินทรีย์ต่าง ๆ จะลดลงอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ โดยกรดแลกติกและกรดซิตริกเป็นกรดอินทรีย์ที่มีปริมาณมากสองลำดับแรกของการหมักสาโทข้าวเหนียวดำ การหมักสาโทข้าวเหนียวดำที่อุณหภูมิ 25°C จะให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุดในวันที่ 6 แต่การหมักสาโทข้าวเหนียวดำที่อุณหภูมิ 30°C จะให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุดในวันที่ 5 (ภาพที่ 4) นอกจากนี้ยังพบว่าการหมักสาโทที่อุณหภูมิสูงส่งผลต่อการเพิ่มของกรดมาลิกและกรดซิตริกอีกด้วย เนื่องจากการหมักที่อุณหภูมิสูงจะเร่งปฏิกิริยาใน Tricarboxylic acids cycle (TCA cycle) ส่งผลให้จุลินทรีย์เร่งกระบวนการเมทาบอลีซึมกลูโคสเป็นกรดอินทรีย์ต่าง ๆ เช่น กรดมาลิก กรดซิตริก กรดซัคซินิก และกรดฟูมาริก [14]

ดังนั้นจากการทดลองสามารถสรุปได้ว่าสภาวะที่เหมาะสมของการหมักสาโทข้าวเหนียวดำด้วย *S. cerevisiae* NCYC 478 ในการวิจัยครั้งนี้คือที่อุณหภูมิ 25°C เวลา 6 วัน โดยจะให้แอลกอฮอล์สูงสุดที่ร้อยละ 9.8 และมีปริมาณกรดมาลิกและกรดซิตริกที่ส่งผลต่อรสเปรี้ยวในสาโทน้อยกว่าการหมักที่ 30°C



ภาพที่ 4 ปริมาณกรดอินทรีย์ในสาโทข้าวเหนียวดำที่ผ่านการหมักด้วย *S. cerevisiae* NCYC 478 ที่อุณหภูมิ 25°C (ก) และ 30°C (ข)
* คือ ผลการทดลองที่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p<0.05$)

ผลของกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ที่มีต่อคุณภาพของสาโทจากข้าวเหนียวดำ

องค์ประกอบทางเคมีของสาโทจากข้าวเหนียวดำพาสเจอร์ไรซ์

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสาโทข้าวเหนียวดำที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์ พบว่า แอลกอฮอล์ในสาโทที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับสาโทข้าวเหนียวดำที่ไม่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์ ($p\geq0.05$) ในขณะที่ความร้อนจะทำให้เกิดการสลายของโมเลกุลน้ำตาลมอลโตสกลายเป็นน้ำตาลกลูโคส จากการทดลองยังพบว่าปริมาณกรดอินทรีย์ที่ระเหยได้ คือ กรดโพรพิโอนิกและกรดอะซิติก ลดลงหลังการพาสเจอร์ไรซ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แต่กรดอินทรีย์ที่ไม่สามารถระเหยได้ คือ กรดแลกติก กรดซัคซินิก กรดมาลิก และกรดซิตริก ยังคงมีการเปลี่ยนแปลงอย่างต่อเนื่อง และไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ ในสาโทข้าวเหนียวดำที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีในสาโทข้าวเหนียวดำที่ผ่านและไม่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์

องค์ประกอบทางเคมี	สาโทจากข้าวเหนียวดำ		ค่านัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%
	ไม่พาสเจอร์ไรซ์	พาสเจอร์ไรซ์	
เอทานอล (% v/v)	10.01±0.07	9.70±0.16	ns
น้ำตาลกลูโคส (g/l)	0.11±0.01	0.96±0.08	*
น้ำตาลมอลโตส (mg/l)	1.71±0.09	0.97±0.07	*
กรดซิตริก (mg/l)	0.86±0.45	1.31±0.11	*
กรดมาลิก (mg/l)	0.45±0.15	0.27±0.04	*
กรดซัคซินิก (mg/l)	1.94±0.19	2.32±0.46	*
กรดแลกติก (mg/l)	1.54±0.36	2.16±0.24	*
กรดอะซิติก (mg/l)	0.57±0.01	0.05±0.02	*
กรดโพรพิโอนิก (mg/l)	0.81±0.06	0.03±0.01	*
ไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ (mg/l)	13.25±0.24	7.07±0.42	*

หมายเหตุ: ตัวเลขที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน จากการทดลอง 3 ซ้ำ
* คือ ผลการทดลองที่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p<0.05$)
ns คือ ผลการทดลองที่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p\geq0.05$)

ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดของสาโทจากข้าวเหนียวดำพาสเจอร์ไรซ์

สาโทข้าวเหนียวดำที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์ เมื่อนำไปตรวจวิเคราะห์หาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ผลการทดลองพบว่าการพาสเจอร์ไรซ์สามารถทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักสาโทข้าวเหนียวดำได้ โดยไม่พบจุลินทรีย์ในตัวอย่างสาโทข้าวเหนียวดำที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์

อภิปรายผลการวิจัย

จากการทดลองพบว่า *A. oryzae* ATCC 22787 สามารถย่อยแป้งในข้าวเหนียวดำให้กลายเป็นน้ำตาล โดยปริมาณน้ำตาลที่ได้มีความใกล้เคียงกับการศึกษาของ อรอง ที่รายงานว่าเชื้อราที่แยกได้จากลูกแป้งข้าวหมาก สามารถย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลได้ในช่วง 2-169 g ต่อปริมาณข้าว 100 g [8] ปริมาณน้ำตาลที่สร้างจากการย่อยแป้งข้าวเหนียวดำจะลดลงตลอดระยะเวลาของการหมัก เนื่องจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของยีสต์จะเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ โดยผลการทดลองมีความใกล้เคียงกับผลการศึกษาของ Dalawai และคณะ กล่าวคือน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการหมักจะถูกเปลี่ยนให้เป็นแอลกอฮอล์ภายใต้สภาวะการหมักแบบไม่มีออกซิเจนโดยยีสต์ผ่าน Glycolytic pathway [15] นอกจากนี้กระบวนการหมักด้วยยีสต์ยังสร้างกรดอินทรีย์ทั้งที่ระเหยได้และระเหยไม่ได้ ซึ่งกรดอินทรีย์ดังกล่าวถูกสร้างจากน้ำตาลกลูโคส ผ่าน TCA Cycle [16]

การพาสเจอร์ไรซ์เป็นวิธีการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการผลิตสาโทได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากตรวจไม่พบจุลินทรีย์ทั้งหมดในสาโทข้าวเหนียวดำที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์ แต่อย่างไรก็ตามความร้อนที่ใช้ในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์อาจจะส่งผลต่อการระเหยของกรดอินทรีย์ เช่น กรดโพรพิโอนิกและกรดอะซิติก ซึ่งอาจจะส่งผลต่อคุณภาพและกลิ่นรสของสาโทข้าวเหนียวดำ โดยผลการทดลองมีความสอดคล้องกับ Kong และคณะ ที่กล่าวว่ากรดอะซิติกสามารถระเหยได้ระหว่างขั้นตอนการพาสเจอร์ไรซ์ (72°C นาน 15 วินาที) และจะเกิดได้ง่ายมากขึ้นหากการพาสเจอร์ไรซ์ทำในระบบเปิด [17] นอกจากนี้ยังพบว่าความร้อนจากการพาสเจอร์ไรซ์ส่งผลต่อการสลายตัวของไซยานิดิน 3-กลูโคไซด์ ซึ่งอาจจะส่งผลให้สีของสาโทข้าวเหนียวดำซีดลงหลังจากการพาสเจอร์ไรซ์ โดยผลการทดลองมีความใกล้เคียงกับการศึกษาของ Odriozola-Serrano และคณะ กล่าวคือการใช้ความร้อนทำให้อาหารที่มีความปลอดภัยต่อการบริโภค แต่ความร้อนก็จะส่งผลให้สี รสชาติ กลิ่น ความคงตัว และองค์ประกอบทางเคมีของผลิตภัณฑ์อาหารเปลี่ยนไป โดยเฉพาะสารประกอบฟีนอลิก แอนโธไซยานินส์ และวิตามิน [18]

สรุปผลการวิจัย

การผลิตสาโทข้าวเหนียวดำจากงานวิจัยครั้งนี้เริ่มจากการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลด้วย *A. oryzae* ATCC 22787 ที่ 30°C นาน 2 วัน จากนั้นหมักด้วย *S. cerevisiae* NCYC 478 ที่ 25°C นาน 6 วัน และพาสเจอร์ไรซ์ที่ 70°C นาน 15 นาที พบว่าการพาสเจอร์ไรซ์สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักได้ โดยที่กระบวนการดังกล่าวไม่ส่งผลต่อการสูญเสียปริมาณแอลกอฮอล์ แต่อย่างไรก็ตามการพาสเจอร์ไรซ์จะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงกรดอินทรีย์ที่ระเหยได้และสีของสาโทข้าวเหนียวดำ

เอกสารอ้างอิง

[1] Wachira, S. (2015). The production of red wine from black jasmine rice. *Journal of Food Research*, 4(6), 69-81.

[2] Yotmanee, S. (2018). *Identification of the characteristic taste, aroma compounds and the corresponding precursors in pigmented rice wine*. PhD Thesis. UK: University of Reading.

[3] Yodmanee, S., Karrila, T. T., & Pakdeechanuan, P. (2011). Physical, chemical and antioxidant properties of pigmented rice grown in Southern Thailand. *International Food Research Journal*, 18(3), 901-906.

[4] อภิชญา เตชะวสัญญู. (2550). *การแยกจำแนกและลักษณะสมบัติของยีสต์และราในลูกแป้งสุราเพื่อการผลิตสาโท.* วิทยานิพนธ์ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. กรุงเทพ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

[5] พกนิษฐ์ พ่วงวีระกุล, และชลมารค พ่วงวีระกุล. (2547). *การประกันคุณภาพสาโท.* รายงานการวิจัย. กรุงเทพ: กรมโรงงานอุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม.

[6] Chuchat, K., Wichai, S., & Varavut, T. (2016). Study on production of Sato from indigenous rice varieties in Nakhon Ratchasima. In *The National and International Graduate Research Conference 2016.* Khon Kaen University.

[7] Wüthrich, B. (2018). Allergic and intolerance reactions to wine. *Allergologie select*, 2(1), 80–88.

[8] อรอง จันทร์ประสาทสุข. (2562). *การคัดแยกและจำแนกจุลินทรีย์จากลูกแป้งเป็นกล้าเชื้อสำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์ข้าวหมัก.* รายงานการวิจัย. มหาวิทยาลัยบูรพา.

[9] Techakanon, C., & Sirimuangmoon, C. (2020). The effect of pasteurization and shelf life on the physicochemical, microbiological, antioxidant, and sensory properties of rose apple cider during cold storage. *Beverages*, 6(3), 1-18.

[10] Zappa, G., Conterno, L., & Gerbi, V. 2001. Determination of organic acids, sugars, diacetyl and acetoin in cheese by high-performance liquid chromatography. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(6), 2722-2726.

[11] Seal, T. (2016). Quantitative HPLC analysis of phenolic acids, flavonoids and ascorbic acid in four different solvent extracts of two wild edible leaves, *Sonchus arvensis and Oenanthe linearis* of North-Eastern region in India. *Journal of Applied Phamaceutical Science*, 6(2), 157-166.

[12] ปิยมาศ แจ่มศรี, และขวัญมิตร รู้จัก. (2560). การทวนสอบอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง Plate count agar (PCA) และ Reasoner’s 2A (R2A) agar สำหรับการตรวจวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในน้ำและน้ำแข็ง. *วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์*, 59(4), 242-251.

[13] Capece, A., Romaniello, R., Siesto, G., & Romano, P. (2018). Conventional and non-conventional yeasts in beer production. *Fermentation*, 4(38), 1-11.

[14] Park, K. M., Seo, J. A., & Kim, Y. S. (2019). Comparative study on metabolic changes of Aspergillus oryzae isolated from fermented foods according to culture conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 307, 1-9.

[15] Dalawai, N., Krupa, K. N., Nadkarni, S., Bharani, S., & Harinikumar, K. M. (2017). Screening of efficient ethanol tolerant yeast strain for production of ethanol. *International journal of pure and applied bioscience*, 5 (1), 744-752.

[16] Liu, D., Zhang, H. T., Xiong, W., Hu, J., Xu, B., Lin, C. C., Xu, L., & Jiang, L. (2014). Effect of temperature on Chinese rice wine brewing with high concentration presteamed whole sticky rice. *BioMed Research International*, 1-8.

[17] Kong, C. T., Ho, C. W., Ling, J. W. A., Lazim, A., Fazry, S., & Lim, S. J. (2018). Chemical changes and optimisation of acetous fermentation time and mother of vinegar concentration in the production of vinegar-like fermented papaya beverage. *Sains Malaysiana*, 47(9), 2017–2026.

[18] Odriozola-Serrano, I., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2008). Phenolic acids, flavonoids, vitamin C and antioxidant capacity of strawberry juices processed by high-intensity pulsed electric fields or heat treatments. *European Food Research and Technology*, 228, 239-248.