P-ISSN 2586-9000
E-ISSN 2586-9027

วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี Homepage : *http://li01.tci-thaijo.org/index.php/tstj*
ปีที่ 30 ฉบับที่ 1 (มกราคม-กุมภาพันธ์ 2565) หน้า [38-50]

การศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ข้าวไทยเพื่อการผลิตมิริน

Feasibility Study of Thai Rice for Mirin Making

ประมวล ทรายทอง[1,*], สุเมธ เทศกุล[2]

[1]*ฝ่ายจุลชีววิทยาประยุกต์ สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร 10900*

[2]*ภาควิชาครุศาสตร์อุตสาหกรรม คณะครุศาสตร์อุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ปทุมธานี 12110*

Pramuan Saithong[1,*], Sumeth Theskul[2]

[1]*Department of Applied Microbiology, Institute of Food Research and Product Development, Kasetsart University, Bangkok 10900*

[2]*Department of Technical Education, Faculty of Technical Education, Rajamangala University of Technology Thanyaburi, Pathum Thani 12110*

Received 2 January 2020; Received in revised from 10 March 2020; Accepted 7 October 2021

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษากระบวนการผลิตมิรินโดยใช้ข้าวไทยซึ่งมีหลากหลายสายพันธุ์ และศึกษาสายพันธุ์เชื้อรา *Aspergillus oryzae* ที่เหมาะสมในการผลิตมิรินเพื่อเป็นแนวทางในการเพิ่มมูลค่าให้กับข้าวและลดการนำเข้ามิรินจากต่างประเทศ จากการศึกษาพบว่าการผลิตมิรินโดยเชื้อรา *A. oryzae* สายพันธุ์ No.3 ที่แยกได้จากผงสปอร์ทางการค้า สามารถผลิตเอนไซม์ α-amylase และย่อยแป้งในข้าวได้ดีที่สุด พันธุ์ข้าวที่เหมาะสมในการเตรียมโคจิ คือ ข้าวเจ้าพันธุ์ชัยนาท เนื่องจากลักษณะโคจิที่ได้เมล็ดข้าวไม่เกาะตัวเป็นก้อน กระจายตัวดี ซึ่งมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ (มีค่าของเอนไซม์ α-amylase เท่ากับ 226.84 units/mL และเอนไซม์ glucoamylase เท่ากับ 46.70 units/mL) จากการศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของการหมักระหว่างของแข็ง (โคจิและข้าวเหนียวนึ่ง) กับของเหลว (สารละลายแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 35 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) พบว่ามิรินสูตร B มีอัตราส่วนการหมักระหว่างของแข็งกับของเหลวเท่ากับ 65 : 35 ซึ่งเป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุด มิรินที่ได้มีสีเหลืองอ่อน ปริมาณแอลกอฮอล์สุดท้ายอยู่ที่ 12.63 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงอยู่ที่ 38.76 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีกลิ่นหอมใกล้เคียงกับมิรินที่มีขายอยู่ในท้องตลาด

คำสำคัญ: ข้าวไทย; เอนไซม์อะไมเลส; มิริน; สารปรุงแต่งรส

***ผู้รับผิดชอบบทความ:** ifrpmst@ku.ac.th **doi:**

Abstract

The objectives of this research were to study the process of mirin making by using Thai rice cultivars, and to investigate a suitable strain of *Aspergillus oryzae.* Another purpose of this study was to create value-added Thai rice product to reduce mirin importation from foreign country. The result showed that mirin produced by *Aspergillus oryzae* strain No.3 isolated from commercial spore produced enzyme α-amylase at the highest level. Meanwhile, Chai Nart, a non-glutinous rice cultivar was the most suitable for preparation of koji because its unaggregation characteristics which are good for enzyme production (226.84 units/mL of α-amylase and 46.70 units/mL of glucoamylase). Study on the suitable ratio of solid (koji and steam glutinous rice): liquid (35% (w/w) of ethyl alcohol) was found that mirin formula B at the ratio of solid: liquid equal to 65 : 35 was the most appropriate because it gave the pale yellow color, residual alcohol concentration 12.63% (v/v) and reducing sugar at 38.76% (w/v) which have a good flavor similar to commercial mirin in the market.

Keywords: Thai-rice; Amylase; Mirin; Seasoning

1. บทนำ

มิริน (mirin) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในการปรุงแต่งรสชาติในอาหารญี่ปุ่น ผลิตจากข้าวเจ้าและข้าวเหนียว มิรินจะช่วยให้อาหารมีความวาวงามดูสดใหม่ ทำให้กลิ่นของอาหารดีขึ้น ปัจจุบันมีการใช้มิรินในภัตตาคารอาหารญี่ปุ่นและโรงงานผลิตและแปรรูปอาหารเป็นจำนวนมาก มีการนำเข้ามิรินเพื่อการบริโภคและใช้ในอุตสาหกรรมอาหารหลายร้อยล้านบาทต่อปี จากข้อมูลของกรมศุลกากรพบว่าระหว่างปี พ.ศ. 2553-2554 ประเทศไทยนำเข้ามิรินจากประเทศต่างๆ ถึงปริมาณ 4,500-5,000 ตันต่อปี คิดเป็นมูลค่า 680-700 ล้านบาท ประเทศไทยยังคงมีการนำเข้ามิรินเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องทุกปีอันเนื่องมาจากกระแสการบริโภคอาหารญี่ปุ่นที่ได้รับความนิยมอย่างมากของคนไทย เนื่องจากมิรินเป็นเครื่องปรุงรสที่ผลิตจากข้าวญี่ปุ่นซึ่งมีลักษณะโครงสร้างทางเคมีของแป้งคล้ายคลึงกับข้าวเหนียวในประเทศไทย หากมีการนำข้าวเหนียวของไทยมาผลิตให้เป็นมิรินได้จะเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับข้าวเหนียวและสร้างรายได้ให้กับชาวนาของไทยอีกทางหนึ่งได้ ที่สำคัญทำให้ประเทศไทยลดการนำเข้ามิรินจากต่างประเทศ ซึ่งเป็นการสูญเสียเงินตราในอัตราสูงเมื่อเทียบกับสินค้านำเข้าชนิดอื่นๆ ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบจากข้อมูลข้างต้นของกรมศุลกากรพบว่าหากเราสามารถผลิตมิรินจากข้าวเหนียวของไทยได้เองแค่เพียง 10 เปอร์เซ็นต์ จากปริมาณการนำเข้าทั้งหมดนั้นย่อมหมายถึงประเทศไทยสามารถประหยัดเงินตราต่างประเทศได้มากกว่า 70 ล้านบาทต่อปี การผลิตมิรินแบบดั้งเดิมเริ่มจากการหมักข้าวเหนียวนึ่ง 628 กรัม ร่วมกับโคจิ (koji) จากเชื้อรา *Aspergillus oryzae* 93 กรัม และแอลกอฮอล์ 35 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก จำนวน 279 กรัม หมักเป็นเวลา 45-60 วัน จะได้ของเหลวสีเหลืองใสเรียกว่ามิรินหรือเหล้าหวาน แอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นดังกล่าวสามารถป้องกันการปนเปื้อนของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสียระหว่างการหมักได้ [1] จากการศึกษาของ Oyashiki และคณะ (1988) [2] พบว่าความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ที่ 12.5 เปอร์เซ็นต์ ใน koji mash ไม่ส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ในโคจิ และยังมีการศึกษาโดย Oyashiki และคณะ (1989) [3] พบว่าเอนไซม์ที่สำคัญในการหมักมิรินเกิดจากเชื้อรา *A. oryzae* สร้างขึ้นในขั้นตอนการหมักโคจิ ได้แก่ เอนไซม์ amylase glucoamylase และ protease เป็นต้น โดยเอนไซม์ amylase และ

glucoamylase จะทำการย่อยแป้งในเมล็ดข้าวเป็นน้ำตาลไดแซ็กคาไรด์และโมโนแซ็กคาไรด์ ทำให้ได้น้ำตาลรีดิวซิงเพิ่มขึ้นเป็น 40 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลาการหมัก 20 วัน รวมถึงผลการศึกษาของ Kanlayakrit และ Maweang (2006) [4] พบว่าอัตราส่วนระหว่างของแข็ง (โคจิและข้าวเหนียวนึ่งสุก) กับของเหลว (สารละลายแอลกอฮอล์ 35 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) ที่ใช้ในการหมักมิริน มีผลต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์มิรินที่ได้ ซึ่งจะผกผันตามอัตราส่วนที่ใช้ โดยหากอัตราส่วนของของเหลวเพิ่มขึ้นจะให้คุณภาพของมิรินที่ได้สีอ่อนลงและปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงต่ำกว่าสูตรดั้งเดิม จากข้อมูลการศึกษาที่กล่าวมานี้พบว่าสายพันธุ์เชื้อรา สายพันธุ์ข้าว อัตราส่วนระหว่างของแข็งกับของเหลวในการหมักมีผลต่อคุณภาพของมิริน

ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อต้องการผลิตมิรินจากการใช้ข้าวไทย โดยทำการคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อราที่เหมาะสม พันธุ์ข้าว รวมถึงการศึกษาหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างของแข็ง (โคจิและข้าวเหนียวนึ่งสุก) ต่อของเหลว (แอลกอฮอล์ 35 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) ที่มีผลกับคุณภาพของการหมักมิรินในระดับห้องปฏิบัติการ ขั้นตอนการหมักมิรินดังแสดงในรูปที่ 1

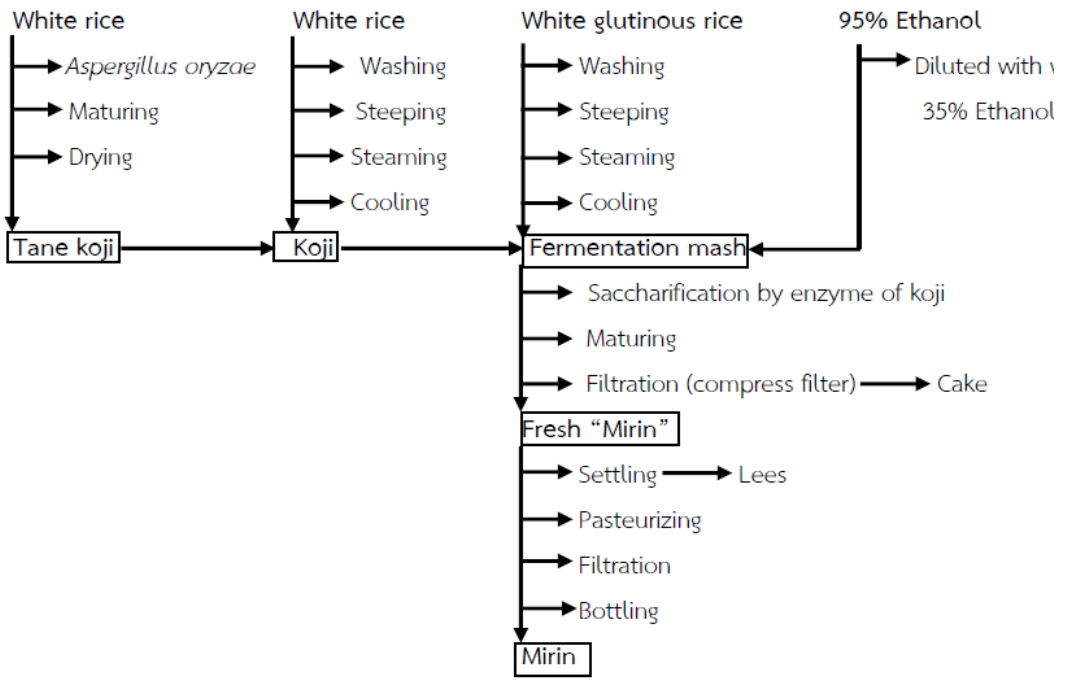

Figure 1 Flow chart of mirin making

2. อุปกรณ์ และวิธีการ

2.1 วัตถุดิบ

2.1.1 พันธุ์ข้าว

พันธุ์ข้าวเจ้า ประกอบด้วย ชัยนาท ปทุม 1 หอมมะลิ 105 และ กข. 47 ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยข้าวชัยนาท ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี และศูนย์วิจัยข้าวนครราชสีมา สำหรับพันธุ์ข้าวเหนียวคือ ข้าวเหนียว กข. 6 จัดซื้อในซูเปอร์มาร์เก็ตจากห้างสรรพสินค้า

2.1.2 เชื้อราสำหรับผลิตทาเนโคจิ (Tane koji)

Aspergillus oryzae จำนวน 9 สายพันธุ์ ได้แก่ ตัวอย่างผงสปอร์สำหรับผลิตมิรินทางการค้าจำนวน 3 ตัวอย่าง (No.1, No.2 และ No.3) สายพันธุ์จากหน่วยเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ (IFRPD Culture Collection) ฝ่ายจุลชีววิทยาประยุกต์ สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จำนวน 2 ตัวอย่าง (IFRPD 4019 และ IFRPD 4021) และศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย จำนวน 4 ตัวอย่าง (TISTR 3031, TISTR 3086, TISTR 3191 และ TISTR 3222) เชื้อราที่ได้มานำมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน

2.2 การเตรียมทาเนโคจิ (Tane koji)

ชั่งข้าวเจ้าพันธุ์ชัยนาท 500 กรัม ใส่ในภาชนะนำมาล้างน้ำแล้วแช่น้ำทิ้งไว้ 3 ชั่วโมง เทน้ำที่แช่ข้าวทิ้ง ทำให้สะเด็ดน้ำ นำมาชั่งใส่ถุงพลาสติกทนร้อนถุงละ 100 กรัม ปิดปากถุงด้วยอุปกรณ์พลาสติกที่ทำให้ถุงเปิดเป็นช่องว่างได้ ปิดด้วยสำลีและอะลูมิเนียมฟอยล์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งให้เย็น นำเชื้อราที่เลี้ยงบนอาหาร PDA slant ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน มาทำ suspension และปิเปตสปอร์เชื้อราปริมาตร 5 มิลลิลิตร (มีจำนวนสปอร์ของเชื้อราอยู่ประมาณ Log 7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร) ลงในถุงข้าว คลุกให้สปอร์เชื้อและข้าวผสมเข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นนำมาอบที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง เก็บรักษาไว้เป็นกล้าเชื้อต่อไป

2.3 การคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อรา และพันธุ์ข้าวที่เหมาะสมในการทำโคจิ

2.3.1 การคัดเลือกพันธุ์เชื้อรา

ชั่งข้าวเจ้าพันธุ์ชัยนาทน้ำหนัก 1 กิโลกรัม นำมาล้างน้ำและแช่น้ำทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 3 ชั่วโมง เทน้ำทิ้ง ทำให้สะเด็ดน้ำ ห่อด้วยผ้าขาวบางแล้วนำไปนึ่งนาน 40 นาที แบ่งใส่กล่องพลาสติกที่มีฝาปิด รอจนอุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 37-40 องศาเซลเซียส จึงเติมทาเนโคจิ 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ผสมให้เข้ากัน โดยแยกทดลองเชื้อราทั้ง 9 ตัวอย่างในแต่ละกล่อง จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างเพื่อนำมาสกัดเอนไซม์จากโคจิแล้วนำไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ α-amylase และ glucoamylase ด้วยวิธี starch iodine color method [5] และกิจกรรมเอนไซม์ protease ดัดแปลงจากวิธีของ Anson [6] โดยใช้เคซีน 1.2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เลือกตัวอย่างเชื้อราที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดมาเพื่อใช้สำหรับเตรียมโคจิกับข้าวเจ้าพันธุ์ต่างๆ ทั้ง 4 สายพันธุ์ ต่อไป

2.3.2 การคัดเลือกพันธุ์ข้าวเจ้าทำโคจิ

ชั่งข้าวเจ้าพันธุ์ต่างๆ 4 สายพันธุ์ ชนิดละ 1 กิโลกรัม นำมาล้างน้ำและแช่น้ำทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2-4 ชั่วโมง ขึ้นกับสายพันธุ์ของข้าวเจ้า เทน้ำทิ้ง ทำให้สะเด็ดน้ำ ห่อด้วยผ้าขาวบางแล้วนำไปนึ่งนาน 40 นาที แบ่งใส่กล่องพลาสติกที่มีฝาปิด รอจนอุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 37-40 องศาเซลเซียส จึงเติมทาเนโคจิ 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ผสมให้เข้ากัน โดยแยกทดลองในแต่ละกล่อง จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจดูคุณลักษณะทางกายภาพของโคจิที่ได้และความเหมาะสมที่ใช้ในการเตรียมโคจิโดยที่มีความสัมพันธ์กับค่ากิจกรรมเอนไซม์ชนิดต่างๆ

2.4 การผลิตมิริน

นำข้าวเหนียว (พันธุ์ กข. 6) มาแช่น้ำที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 ชั่วโมง เทน้ำทิ้ง ทำให้สะเด็ดน้ำ นำไปนึ่งเป็นเวลานาน 40-50 นาที ผึ่งให้เย็น จากนั้นนำมาผสมกับโคจิ และแอลกอฮอล์ 35 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก ให้เข้ากัน ทำการศึกษาหาอัตราส่วนของวัตถุดิบที่ใช้ในการหมักระหว่างของแข็ง (โคจิและข้าวเหนียวนึ่งสุก) กับส่วนที่เป็นของเหลว (แอลกอฮอล์ 35 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) เปรียบเทียบกับสูตรควบคุมที่ใช้อัตราส่วนของโคจิ : ข้าวเหนียวนึ่งสุก เท่ากับ 1 : 6.75 ตามการทดลองของ Uchida และ Oka (1983) [1] แล้วทำการเปรียบเทียบหาอัตราส่วนที่เหมาะสมดังแสดงในตารางที่ 1 หมักไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 35±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 เดือน ในระหว่างการหมักทำการสุ่มเก็บตัวอย่างมิรินมาศึกษาในวันที่ 0, 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 เพื่อวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีและกายภาพ

Table 1 Comparison on the various ratios of solid (koji + steam glutinous rice) and liquid (alcohol 35% (w/w)) for mirin production.

Materials	Mirin formula			
	Control*	A	B	C
Koji (g)	93	100	100	100
Steamed glutinous rice (g)	628	600	550	500
Alcohol 35% (w/w) (g)	279	300	350	400
Total amount (g)	1,000			
Ratio of koji : steamed glutinous rice	1 : 6.75	1 : 6	1 : 5.5	1 : 5
Ratio of solid : liquid	72.1 : 27.9	70 : 30	65 : 35	60 : 40

Note: * = Control formula [1]

2.5 การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีและกายภาพของมิริน

2.5.1 วิเคราะห์หาปริมาณกรดแลคติก ดัดแปลงตามวิธีของ AOAC [7] ปิเปตตัวอย่าง 9 มิลลิลิตรลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมฟีนอฟธาลีน 3 หยด ไตเตรทด้วย 0.1 นอร์มอลของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์จนกระทั่งเกิดสีชมพู

2.5.2 วิเคราะห์หาปริมาณแอลกอฮอล์ตามวิธีของ Gunduz และคณะ (2013) [8] โดยปิเปตตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับ Internal standard ไอโซโพพานอล (2-propanol) 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในขวด Vial Headspace ปิดฝาให้สนิทนำไปทดสอบด้วยเครื่อง Gas Chromatography และ Headspace เทียบกับกราฟมาตรฐาน

2.5.3 วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซิง (reducing sugar) ตามวิธี DNS method [9] โดยปิเปตตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลาย DNS 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือด 10 นาที ทำให้เย็นอย่างรวดเร็วก่อนเติมน้ำกลั่นลงไป 10 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย spectrophotometer (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Scientific, USA) ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร เทียบผลกับกราฟมาตรฐาน

2.5.4 วิเคราะห์หาปริมาณกิจกรรมเอนไซม์ α-amylase โดยนำสารละลายเอนไซม์ทำปฏิกิริยากับสารละลายน้ำแป้งต้มสุก จากนั้นนำสารละลายสับสเตรตวัดปริมาณการทำปฏิกิริยากับสารละลายไอโอดีน นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร โดยกำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์คือค่าดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนไป 1 หน่วยภายในเวลา 10 นาที ที่สภาวะทดลองเทียบกับชุดควบคุม การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ glucoamylase ทดสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยการนำวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคส และคำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกราฟมาตรฐานกลูโคส โดยกำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์เท่ากับปริมาณน้ำตาลกลูโคส 1.0 ไมโครโมลที่ถูกปล่อยออกมาภายในเวลา 1 นาที ที่สภาวะทดลอง [10] การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ Protease (ดัดแปลงจาก Anson, 1938 [6]) โดยการทดสอบการทำปฏิกิริยากับสารละลายเคซีน จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมสารละลาย TCA ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนสมบูรณ์ที่อุณหภูมิห้อง กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 นำส่วนใสผสมกับสารละลาย Na_2CO_3 จากนั้นเติมสารละลาย folin-ciocalteu ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร นำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานไทโรซีนและคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส โดยกำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์เท่ากับปริมาณไทโรซีน 1.0 ไมโครกรัมที่ถูกย่อยในเวลา 1 นาที ที่สภาวะทดลอง

2.5.5 วิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ โดยใช้เครื่อง hand refractometer (N-1α, 0-32° Brix, Atago, Japan) โดยหยดตัวอย่างบนแผ่นปริซึม อาศัยหลักการหักเหของแสงในการวัดความเข้มข้นของสารละลาย ค่าที่ได้มีหน่วยเป็นองศาบริกซ์

2.5.6 วัดสี โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย spectrophotometer (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Scientific, USA) ที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร

2.6 การวิเคราะห์วางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การทดลองทั้งหมดทำจำนวนซ้ำของการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ ข้อมูลที่ได้หาค่าเฉลี่ย (mean) กับ standard deviation และนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติด้วย one-way ANOVA วิเคราะห์ความแตกต่างด้วยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 การคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อรา และพันธุ์ข้าวที่เหมาะสมในการทำโคจิ

เชื้อรา *Aspergillus oryzae* จำนวน 9 สายพันธุ์ ที่นำมาเตรียมโคจิด้วยข้าวเจ้าพันธุ์ชัยนาท พบว่าโคจิที่เตรียมจากเชื้อราสายพันธุ์ No.3 มีกิจกรรมเอนไซม์ α-amylase สูงที่สุดคือ 226.84 units/ml คิดเป็น relative activity 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับเชื้อราสายพันธุ์อื่น และยังมีกิจกรรมเอนไซม์ glucoamylase สูงด้วยเช่นกัน แต่น้อยกว่าเชื้อราสายพันธุ์ No.1 ดังแสดงในรูปที่ 2 เนื่องจากการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลต้องการเอนไซม์ 2 ชนิด เพื่อย่อยโมเลกุลขนาดใหญ่ของแป้งให้มีขนาดเล็กลง โดยเอนไซม์ α-amylase จะเข้าทำการย่อยแป้งให้ได้ขนาดโมเลกุลที่เล็กลงก่อน จากนั้นจึงทำการย่อยต่อด้วยเอนไซม์ glucoamylase เพื่อให้ได้น้ำตาลรีดิวซิง ดังนั้นจากผลการศึกษาการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์จึงพิจารณาเลือกเชื้อราสายพันธุ์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ α-amylase ได้สูงสุดคือเชื้อรา No.3 (226.84 units/mL) มาใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ข้าวต่อไป

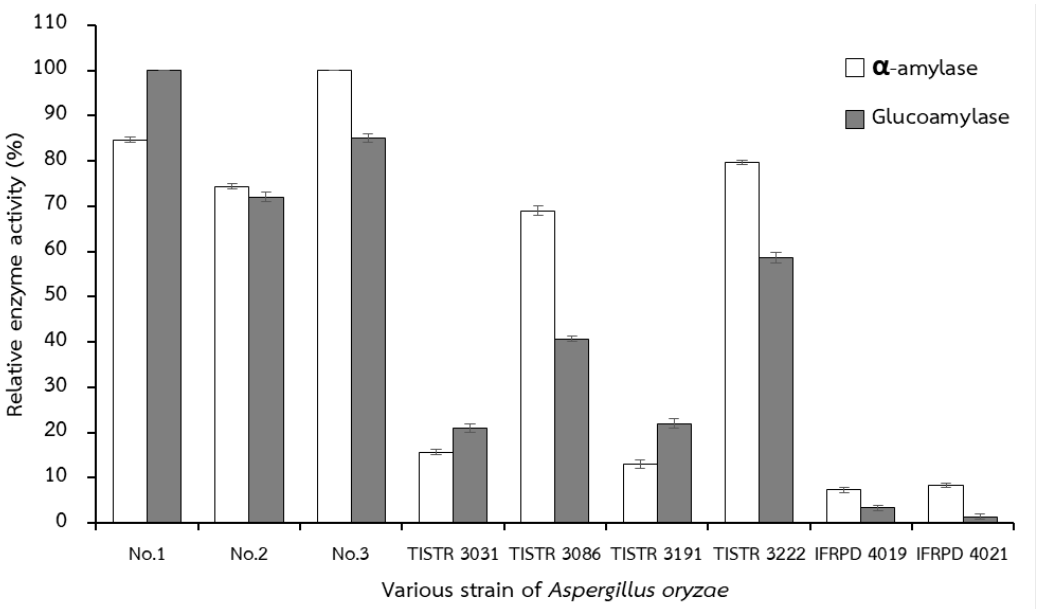

Figure 2 Relative enzyme activities of α-amylase and glucoamylase from various strains of *Aspergillus oryzae*

ผลการศึกษาพันธุ์ข้าวเจ้าที่เหมาะสมในการเตรียมโคจิ ได้ทำการทดลองโดยใช้เชื้อรา No.3 ที่ได้จากการคัดเลือกข้างต้น นำมาเลี้ยงบนข้าวเจ้าพันธุ์ต่างๆ 4 สายพันธุ์ (ชัยนาท ปทุม 1 หอมมะลิ 105 และ กข. 47) พบว่าโคจิที่เตรียมได้จากข้าวเจ้าพันธุ์ชัยนาทให้ลักษณะของเมล็ดข้าวที่ไม่จับตัวเป็นก้อนและมีการกระจายตัวของเมล็ดข้าวดีที่สุด รองลงมาคือพันธุ์ปทุม 1 พันธุ์หอมมะลิ 105 และพันธุ์ กข. 47 ดังตารางที่ 2 และรูปที่ 3

Table 2 Physical characteristic of koji prepared by various rice cultivars

Cultivars of rice	Appearance[a]
Chai-nart	+ + + +
Prathom 1	+ + +
Hom-mali 105	+ +
Kor-Chor 47	+

Note: a = แสดงการกระจายตัวของข้าวเมื่อเตรียมเป็นโคจิ:

+ + + + กระจายตัวมากที่สุด + + + กระจายตัวปานกลาง + + กระจายตัวน้อย + กระจายตัวน้อยที่สุด

Figure 3 Characteristics of koji prepared from four rice cultivars; A = Chai-nart, B = Prathom 1, C = Hom-mali 105 and D = Kor-Chor 47

นอกจากนี้ผลการศึกษาพบว่ากิจกรรมเอนไซม์ α-amylase, glucoamylase และ protease ของโคจิที่เตรียมได้จากข้าวเจ้าพันธุ์ชัยนาทมีกิจกรรมเอนไซม์สูงกว่าข้าวเจ้าสายพันธุ์อื่นๆ อีกด้วย เนื่องจากโคจิที่เตรียมจากข้าวพันธุ์ชัยนาทให้ลักษณะการกระจายตัวของเมล็ดข้าวและไม่จับตัวกันเป็นก้อน จึงทำให้เชื้อราสามารถเจริญและสร้างเอนไซม์ได้ดี ดังแสดงในรูปที่ 4 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kanlayakrit และ Maweang (2006) [4]

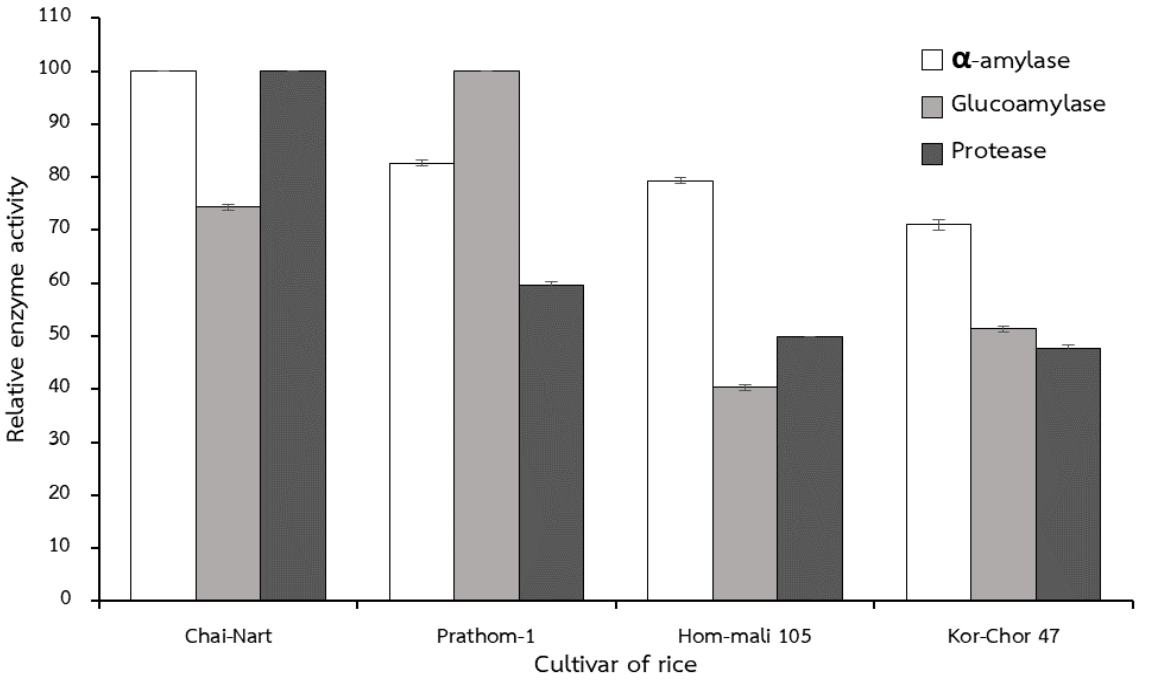

Figure 4 Relative enzyme activities of *Aspergillus oryzae* strain No.3 on various rice cultivars.

3.2 การหาอัตราส่วนของวัตถุดิบในการหมักระหว่างของแข็ง (โคจิและข้าวเหนียวนึ่งสุก) กับของเหลว (แอลกอฮอล์ 35 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)

ผลการทดลองหมักมิรินที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 2 เดือนที่อัตราส่วนต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 3 พบว่าองค์ประกอบทางเคมีและกายภาพของมิรินทั้ง 4 สูตรในระหว่างการหมักมีปริมาณใกล้เคียงกัน คือมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (total soluble solid) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซิง (reducing sugar) เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการหมัก ทั้งนี้ในช่วงแรกของการหมักเมล็ดข้าวเหนียวนึ่งจะดูดซับสารละลายแอลกอฮอล์ 35 เปอร์เซ็นต์ เข้าไปจนเมล็ดข้าวบวมพองขึ้น และมีเอนไซม์ที่ผลิตโดยเชื้อราในโคจิช่วยแป้งในเมล็ดข้าวเหนียวจึงทำให้ได้สารละลายส่วนที่เป็นของเหลวเพิ่มขึ้น และจากผลของทดลองของ Uchida และ Oka (1983) [1] ได้กล่าวว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงในส่วนของของเหลวที่ถูกย่อยจะมีค่าถึง 39 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลาของการหมักเพียง 20 วัน และขณะเดียวกันปริมาณแอลกอฮอล์จะลดลงอย่างรวดเร็วจาก 35 เปอร์เซ็นต์ เป็น 10-13 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 10 วันของการหมัก ตามลำดับ

ตารางที่ 3 แสดงผลจากการวิเคราะห์ตัวอย่างมิรินทั้ง 4 สูตร ภายหลังจากทำการหมักแล้ว 2 เดือน พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงอยู่ในช่วงระหว่าง 35-45 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาณแอลกอฮอล์ในตัวอย่างมิรินทั้ง 4 สูตรมีค่าระหว่าง 10-14 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ซึ่งปริมาณแอลกอฮอล์สุดท้ายในมิรินทั้ง 4 สูตรขึ้นอยู่กับอัตราส่วนระหว่างของแข็งต่อของเหลว ในขณะที่สูตรควบคุมจะมีปริมาณแอลกอฮอล์ต่ำสุด (10.25 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร) สำหรับสูตร A, B และ C มีปริมาณแอลกอฮอล์อยู่ที่ 11.20, 12.63 และ 13.57 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ตามลำดับ เมื่อทำการวัดค่าสี (color) ของมิรินที่ได้พบว่าสูตร C ที่มีการใช้ปริมาณแอลกอฮอล์สูงสุดจะให้ค่าสีต่ำสุด (0.167, A_{440}) และ

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงน้อยสุด (35.40 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) เนื่องด้วยมีปริมาณส่วนที่เป็นของแข็ง (โคจิและข้าวเหนียวนึ่ง) มีสัดส่วนน้อยที่สุด ดังนั้นปริมาณวัตถุดิบที่เอนไซม์ย่อยให้กลายเป็นน้ำตาลรีดิวซิงมีปริมาณน้อยกว่าสูตรอื่นๆ จากข้อมูลในตารางที่ 3 พบว่ามิรินสูตร A มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซิง 41.97 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (total soluble solid) เท่ากับ 39 บริกซ์ ซึ่งมีส่วนประกอบที่ใกล้เคียงกับมิรินสูตรดั้งเดิมที่ได้พัฒนาขึ้นโดย Uchida และ Oka (1983) [1] จึงสามารถสรุปได้ว่าสภาวะและอัตราส่วนของมิรินสูตร A ให้คุณลักษณะทางเคมีกายภาพของมิริน ที่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซิง ปริมาณแอลกอฮอล์ และของแข็งที่ละลายได้อยู่ในเกณฑ์คุณภาพของมิรินที่มีการผลิตแบบดั้งเดิมของประเทศญี่ปุ่นที่มีสีเหลืองทอง ความใสเป็นประกาย ส่วนสูตร B และ C มีคุณภาพรองลงมาด้วยองค์ประกอบของน้ำตาลรีดิวซิงที่น้อยกว่า และสีของมิรินจะให้สีอ่อนกว่า ซึ่งคุณภาพด้านปริมาณน้ำตาลรีดิวซิง ความเข้มของสีเหลืองและราคาจะเป็นปัจจัยในการเลือกซื้อมิรินต่อผู้บริโภค ส่วนค่าพีเอช (pH) และปริมาณกรดแลคติก มีค่าที่ใกล้เคียงกันในทุกสูตรที่ทำการทดลองในครั้งนี้

3.3 การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางเคมี กายภาพของมิรินที่หมักในอัตราส่วนระหว่างของแข็ง (โคจิและข้าวเหนียวนึ่งสุก) กับของเหลว (แอลกอฮอล์ 35 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) ที่ต่างกัน

จากการทดลองหมักมิรินด้วยอัตราส่วนระหว่างของแข็งต่อของเหลวในอัตราส่วนต่างๆ เปรียบเทียบกับสูตรควบคุม แสดงดังตารางที่ 2 สามารถสรุปได้ว่าองค์ประกอบหลักทางเคมี ได้แก่ ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (total soluble solid) และน้ำตาลรีดิวซิง มีค่าสูงขึ้นตามระยะเวลาของการหมักแสดงดังรูปที่ 5 โดยที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงที่เกิดขึ้นในแต่ละสูตรจะมีความผันแปรตามอัตราส่วนของของแข็งต่อของเหลว และปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงที่เกิดขึ้นจะเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ จนสิ้นสุดการหมัก ส่วนปริมาณแอลกอฮอล์จะลดลงตามระยะเวลาของการหมัก โดยจะแปรผันตามอัตราส่วนระหว่างของแข็งและของเหลว จากการทดลองพบว่าสูตรที่ใช้ปริมาณแอลกอฮอล์มากที่สุดในการหมักคือสูตร C (อัตราส่วน 60 : 40) พบว่าจะมีปริมาณแอลกอฮอล์ในมิรินสูงสุดเท่ากับ 13.57 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร สูตรควบคุมใช้ปริมาณแอลกอฮอล์น้อยสุด (อัตราส่วน 72.1 : 27.9) จะมีแอลกอฮอล์ในมิรินสุดท้ายอยู่ที่ 10.25 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ส่วนสูตร A (11.20 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร) และสูตร B (12.63 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร) ตามลำดับ ในส่วนของการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางกายภาพ พบว่า สีของผลิตภัณฑ์มิรินจะแปรผันกับปริมาณของของเหลว (แอลกอฮอล์ 35 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) ที่ใช้เป็นส่วนผสมในการหมักที่เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับสูตรควบคุม โดยให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kanlayakritc (2006) และ Maweang (2006) [4] นอกจากนี้พบว่าสีของมิรินจะมีการเปลี่ยนแปลงโดยมีสีจะเข้มขึ้นตามระยะเวลาของการหมัก เนื่องจากระหว่างการหมักมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงเกิดเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ทำให้ปฏิกิริยาที่น้ำตาลรวมกับโปรตีนที่มีอยู่ในสารละลายเกิดปฏิกิริยา Maillard reaction อย่างช้าๆ

Table 3 Chemical and physical compositions of mirin at various ratios of solid and liquid

Formula	Ratios of solid: liquid	Chemical and physical compositions of mirin					
		pH	Acidity as lactic acid (% w/v)	Reducing sugar (% w/v)	Soluble solid (°Brix)	Alcohol (% v/v)	Color (A_{440})
Control	72.1:27.9	5.65±0.03^{b}	0.28±0.01^{a}	44.54±0.03^{a}	40.96±0.03^{a}	10.25±0.12^{d}	0.346±0.01^{a}
A	70:30	5.64±0.05^{b}	0.25±0.05^{a}	41.97±0.05^{b}	39.51±0.04^{a}	11.20±0.27^{c}	0.297±0.01^{b}
B	65:35	5.70±0.01^{a}	0.19±0.02^{b}	38.77±0.11^{c}	38.00±0.01^{b}	12.63±0.15^{b}	0.185±0.03^{c}
C	60:40	5.78±0.05^{a}	0.18±0.03^{b}	35.40±0.09^{d}	33.50±0.06^{c}	13.57±0.48^{a}	0.167±0.13^{d}

Different superscript letters within columns expressed significant difference ($p \leq 0.05$)

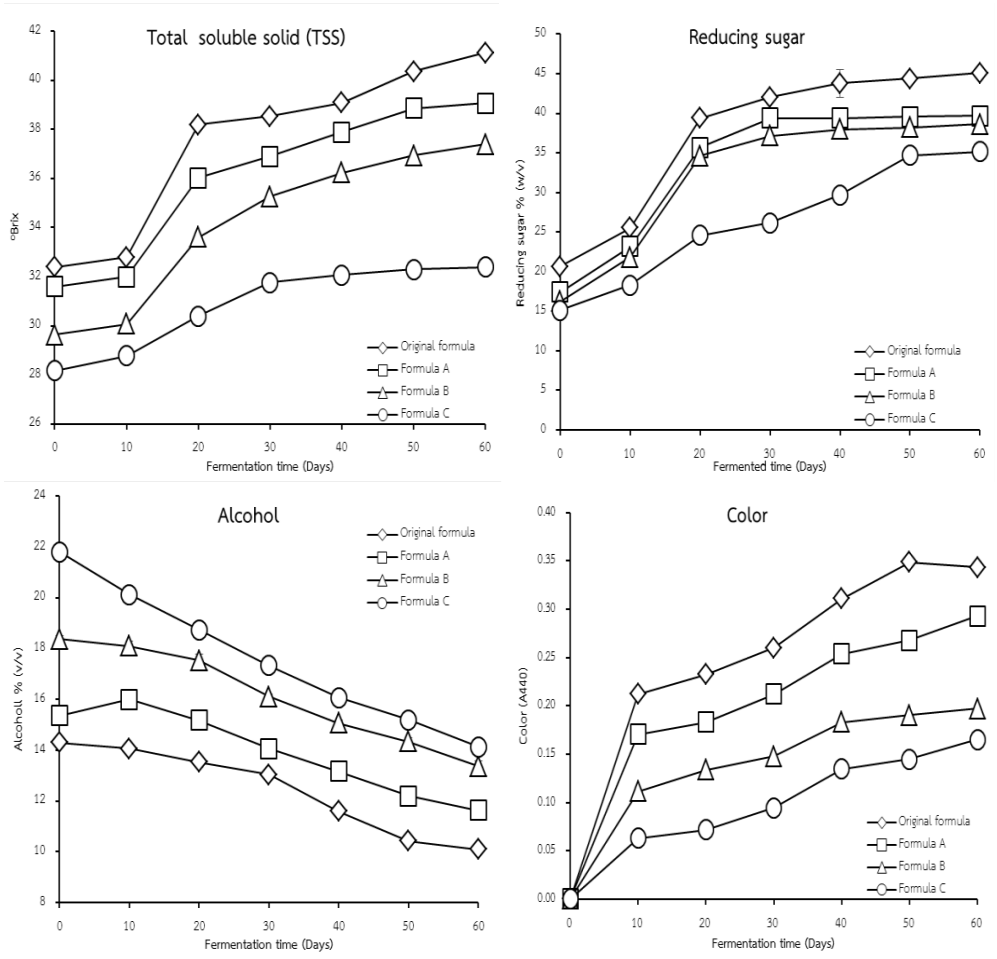

Figure 5 Chemical and physical compositions change of mirin at various ratios of solid and liquid : control formula (◇), formula A (□), formula B (△) and formula (○)

4. สรุปผลการวิจัย

การศึกษาวิธีการผลิตมิรินจากข้าวพันธุ์ต่างๆ ในประเทศไทยที่มีการใช้เชื้อรา *Aspergillus oryzae* เป็นแหล่งผลิตเอนไซม์ พบว่าสายพันธุ์เชื้อราที่แยกได้จากผงสปอร์ผลิตมิรินทางการค้า No.3 สามารถผลิตเอนไซม์และให้กิจกรรมของเอนไซม์ α-amylase ได้สูงสุดและสามารถย่อยแป้งในข้าวได้ดีที่สุด นอกจากนี้ยังสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอส (protease) ได้ปริมาณสูง สำหรับพันธุ์ข้าวที่เหมาะสมในการเตรียมโคจิคือข้าวเจ้าพันธุ์ชัยนาท เนื่องจากโคจิที่เตรียมจากข้าวพันธุ์ชัยนาทนั้นให้ลักษณะของเมล็ดข้าวที่ไม่เกาะตัวกันเป็นก้อนและมีกระจายตัวได้ดี ทำให้เชื้อราสามารถเจริญและผลิตเอนไซม์และสร้างกิจกรรมเอนไซม์ได้สูงสุด จึงเหมาะในการนำไปใช้ในการผลิตเป็นโคจิและเหมาะกับการนำไปใช้หมักกับข้าวเหนียวนึ่งสุกในการผลิตมิริน นอกจากนี้ผลจากการหาอัตราส่วนการหมักที่เหมาะสมระหว่างของแข็ง (โคจิและข้าวเหนียวนึ่ง) กับของเหลว (สารละลายแอลกอฮอล์ 35 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) พบว่ามิรินสูตร B ซึ่งมีอัตราส่วนการหมักระหว่างของแข็งกับของเหลวเท่ากับ 60 : 35 เป็นอัตราส่วนที่มีความ

เหมาะสมในการหมักมิรินมากที่สุดเนื่องจากมิรินที่ได้มีคุณลักษณะที่ดี คือมีสีเหลืองอ่อน มีความใส มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงอยู่ที่ 38.76 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ซึ่งอยู่ในมาตรฐานของมิรินที่มีการจำหน่ายในทางการค้า และมีปริมาณแอลกอฮอล์อยู่ที่ 12.63 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร อีกทั้งผลผลิต (yield) ที่ได้จากการหมักยังมีปริมาณสูงกว่าสูตรควบคุมและสูตร A นอกจากนั้นมิรินสูตร B ยังจะมีกลิ่นของผลิตภัณฑ์ที่ดีกว่าสูตรควบคุมและสูตร A ผลการศึกษาที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Hashizume และคณะ (2013) [11] ที่ได้ทำการวิเคราะห์หาสารที่ทำให้เกิดกลิ่นที่ดีในสาเกและมิริน พบว่าสารสำคัญที่เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์มิรินในอาหารญี่ปุ่นนั้นมาจากเอนไซม์ในโคจิ (rice koji enzyme) และขึ้นอยู่กับปริมาณโคจิที่ใช้ในการหมัก ผลจากการศึกษาวิจัยนี้ครั้งนี้สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดเพื่อการผลิตมิรินในระดับขยายกำลังการผลิตในเชิงพาณิชย์เพื่อลดการนำมิรินจากต่างประเทศต่อไปในอนาคต

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยจากโครงการ Innovation Hub-Agriculture & Food เพื่อสร้างเศรษฐกิจฐานนวัตกรรมของประเทศตามนโยบายประเทศไทย 4.0 ปี พ.ศ. 2560 ประเภท Start Up ของที่ประชุมอธิการบดีแห่งประเทศไทย

6. References

[1] Uchida, M. and S. Oka, 1983, Efficiency of utilization of raw materials in conventional mirin-making, J. Ferment technol, 61(1): 13-18.

[2] Oyashiki, H., M. Uchida, A. Obayashi and S. Oka, 1988, Mirin-making using long-life koji with low water content, J. Ferment technol, 65(6): 643-649.

[3] Oyashiki, H., M. Uchida, A. Obayashi, S. Oka, 1989, Evaluation of koji prepared with various molds for mirin-making, J. Ferment bioeng, 67(3): 163-168.

[4] Kanlayakrit, W. and M. Maweang, 2006, Production of seasoning “Mirin” from Thai rice by fermentation, Kasetsart J., (Nat. Sci.) 40 (Suppl.): 39-46.

[5] Kanlayakrit, W., 1987, Studies on raw-starch digesting of fungal glucoamylase, Ph.D Thesis, Kyushu university Japan.

[6] Anson M L., 1938, Estimation of Pepsin Papain and Cathepsin with Heamoglobin, J. Gen Physiol, 22: 79-89.

[7] AOAC., 1990, Official methods of analysis (16th Ed.). Arlington VA, USA, Association of official analytical chemists.

[8] S. Gündüz, H. Yılmaz and A. C. Gören, 2013, Halal Food and Metrology: Ethyl Alcohol Contents of Beverages, J. Chem metrol. 7(1): 7-9.

[9] Miller, G.L., 1959, Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, Analytical Chemistry, 31:426-428.

[10] Kanlayakrit, W., K. Ishimatsu, M. Nakao and S. Hayashida, 1987, Characteristics of raw-starch-digesting glucoamylase from thermophilic Rhizomucor pusillus, J. Ferment Tech. 65: 379-385.

[11] Hashizume K, Yoshioka N, Fernandez EB, 2013, Three misuse patterns for Cloud Computing, In Security engineering for Cloud Computing: approaches and Tools. Edited by: Rosado DG, Mellado D, Fernandez-Medina E, Piattini M. Pennsylvania, United States: IGI Global: 36-53.