

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักน้ำส้มสายชูจากรำข้าวละเอียด Optimizing the fermentation process of vinegar from fine rice bran

จุฑาทิพย์ พลรักษา¹ นิภาพร ก้านทอง¹ และ อัจฉรา มะโนวัฒนา^{1*}

Jutatip Ponraksa¹, Nipaporn Kanthong¹ and Atchara Manowattana^{1*}

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากรำข้าวละเอียด โดยกระบวนการหมัก 2 ขั้นตอน ประกอบด้วยกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ ตามด้วยกระบวนการหมักน้ำส้มสายชู จากการวิเคราะห์องค์ประกอบพบว่ารำข้าวละเอียด มีปริมาณโปรตีนสูง (17.17 กรัมต่อรำข้าวละเอียด 100 กรัม) และคาร์โบไฮเดรตสูง (53.01 กรัมต่อรำข้าวละเอียด 100 กรัม) เป็นแหล่งไนโตรเจน และคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในกระบวนการเปลี่ยนแปลงชีวภาพของจุลินทรีย์ การทดลองหมักแอลกอฮอล์จากรำข้าวละเอียดใน ขั้นตอนนี้ให้ความเข้มข้นแอลกอฮอล์สูงสุดที่ร้อยละ 9.90 ± 0.36 ปริมาตรต่อปริมาตร โดยใช้ลูกแป้งสาโทเป็นหัวเชื้อ จากนั้นนำแอลกอฮอล์ไปใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับหมักกรดอะซิติก โดยใช้เชื้อ *Acetobacter aceti* TISTR1053 ซึ่งให้ปริมาณกรดอะซิติกสูงสุดที่ร้อยละ 3.60 ± 0.06 น้ำหนักต่อปริมาตร หลังจากการหมักภายใต้สภาวะให้อากาศเป็นเวลา 9 วัน ผลการวิจัยชี้ให้เห็นว่ารำข้าวละเอียดเป็นวัสดุตั้งต้นที่เหมาะสมสำหรับการผลิตน้ำส้มสายชูหมักที่มีคุณภาพเทียบเท่ากับน้ำส้มสายชูหมักจากข้าวในเชิงพาณิชย์ กระบวนการนี้ช่วยเพิ่มมูลค่าให้กับผลิตภัณฑ์พลอยได้จากอุตสาหกรรมสีข้าวได้อย่างมีประสิทธิภาพ ก่อให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่มีประโยชน์และดีต่อสุขภาพ

คำสำคัญ: รำข้าวละเอียด น้ำส้มสายชูหมัก แอลกอฮอล์ กระบวนการหมัก

Abstract

This research aimed to determine the optimal conditions for producing vinegar from fine rice bran through a two-step fermentation process, comprising alcoholic fermentation followed by acetic acid fermentation. Compositional analysis revealed that the fine rice bran contained high levels of protein (17.17g/100g fine rice bran) and carbohydrates (53.01g/100g fine rice bran), making it as an excellent nitrogen and carbon sources for microbial biotransformation. The initial alcoholic fermentation yielded a maximum alcohol concentration of $9.90 \pm 0.36\%$ (v/v) by using Look-Pang Sato as an inoculation. Subsequently, this alcohol was used as a substrate for acetic acid fermentation with *Acetobacter aceti* TISTR1053, which achieved a maximum acetic acid concentration of $3.60 \pm 0.06\%$ (w/v) after 9 days under aerated conditions. The findings indicated that fine rice bran is a viable substrate for producing a fermented vinegar with quality comparable to that of commercial rice vinegars. This process effectively adds value to a by-product of the rice milling industry, creating a beneficial and healthful product.

Keywords: fine rice bran, vinegar, alcohol, fermentation process

¹ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก

¹ Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Tawan-ok

* Corresponding author. E-mail: atchara_ma@rmutto.ac.th

บทนำ

น้ำส้มสายชูหมักได้รับการยอมรับว่าเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเนื่องจากมีกรดอะซิติกในปริมาณสูงและมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากสารตั้งต้นจากกระบวนการหมัก น้ำส้มสายชูนิยมใช้ในอุตสาหกรรมแปรรูปอาหาร อุตสาหกรรมเคมี และอุตสาหกรรมยา จากการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่าน้ำส้มสายชูหมักมีคุณสมบัติ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ลดความดันโลหิต ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ป้องกันโรคหัวใจและหลอดเลือด การบริโภคน้ำส้มสายชูทุกวัน พบว่า ช่วยปรับปรุงการตอบสนองของน้ำตาลในเลือด ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อผู้ป่วยโรคเบาหวาน (Nazir et al., 2019) ดังนั้น น้ำส้มสายชูหมักจึงถูกนำมาใช้เพื่อประโยชน์ทางการแพทย์และสุขภาพ หนึ่งในน้ำส้มสายชูหมักที่ได้รับความนิยมในทวีปเอเชียคือ น้ำส้มสายชูหมักจากข้าว ซึ่งเป็นน้ำส้มสายชูหมักแบบดั้งเดิมและถูกใช้อย่างแพร่หลายเป็นเครื่องปรุงรสอาหาร มาเป็นเวลานานในประเทศแถบเอเชียสามารถผลิตได้จากข้าวสายพันธุ์ต่าง ๆ (Ho et al., 2017; Taweekasemsombut et al., 2021) การหมักน้ำส้มสายชูข้าวแบบของแข็ง (solid state fermentation) ประกอบด้วยสี่ขั้นตอนต่อเนื่อง ขั้นตอนแรกคือการเตรียมโคจิ โดยการเพาะเชื้อ *Aspergillus oryzae* บนข้าวสอยเพื่อผลิตเอนไซม์และสารเมแทบอไลต์อื่น ๆ สำหรับการหมักน้ำส้มสายชูข้าว (Kanauchi et al., 2013) ขั้นตอนนี้เรียกอีกอย่างว่า แซคคาริฟิเคชัน (saccharification) ซึ่งเปลี่ยนแป้งเป็นอะไมโลสและน้ำตาล เช่น กลูโคสและโอลิโกแซ็กคาไรด์อื่น ๆ ขั้นตอนที่สองน้ำตาลที่ถูกปลดปล่อยจากแซคคาริฟิเคชันจะถูกเปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์ (เอทานอล) โดย *Saccharomyces cerevisiae* ขั้นตอนที่สามคือการหมักกรดอะซิติก ซึ่งเอทานอลจะถูกออกซิไดซ์เป็นกรดอะซิติกโดย *Acetobacter* sp. และขั้นตอนสุดท้ายคือกระบวนการบ่มซึ่งจะเก็บผลิตภัณฑ์น้ำส้มสายชูไว้ที่อุณหภูมิต่ำเป็นเวลา 2-3 เดือน (ขึ้นอยู่กับชนิดของน้ำส้มสายชู) (Taweekasemsombut et al., 2021)

รำข้าวละเอียดเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้จากกระบวนการสีข้าว มีองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญ ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน กรดอะมิโน แร่ธาตุ วิตามิน และเอนไซม์ กล่าวได้ว่ารำข้าวเป็นแหล่งวัตถุดิบที่มีคุณค่าสารอาหารสูง จึงนิยมนำไปใช้เป็นส่วนผสมในอาหารต่างๆ นอกจากนี้ยังนับว่าเป็นแหล่งสำคัญของสารต้านอนุมูลอิสระ ช่วยยังยั้งการเกิดโรคต่าง ๆ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบในรำข้าวส่วนใหญ่คือ แกรมมา-โอริซานอล (gamma-oryzanol) (Sangkod et al., 2021) และยังพบว่าสามารถต้านการอักเสบ ต้านอนุมูลอิสระ ลดปริมาณไขมันในเลือด ลดอัตราการเกิดโรคเบาหวาน ช่วยกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกัน และยับยั้งการเกิดโรคเมะเร็งได้ (Ferronato et al., 2021) อย่างไรก็ตามรำข้าวยังมีคุณสมบัติในการดูดซับ (absorption) และการคาย (desorption) ความชื้นได้สูง ทำให้ความชื้นในรำข้าวมีค่าเปลี่ยนแปลงไปตามค่าความชื้นสัมพัทธ์ (relative humidity) ของบรรยากาศ ซึ่งจากคุณสมบัติดังกล่าวทำให้มีผลต่อองค์ประกอบและความเสถียรของรำข้าวทั้งทางด้านกายภาพและเคมี ในระหว่างการเก็บรักษาได้ จึงไม่ควรเก็บไว้นานเพราะจะมีกลิ่นจากการหืน รำข้าวที่ได้จากการสีข้าวเก่ามีความชื้นต่ำทำให้เก็บได้นานกว่ารำข้าวใหม่ที่มีความชื้นสูง เชื้อราขึ้นง่ายและเหม็นหืนเร็ว (Sangkod et al., 2021)

Pazuch et al., (2020) ได้ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมและคุณสมบัติของน้ำส้มสายชูที่ผลิตจากรำข้าว (สกัดน้ำมันออก) โดยใช้เอนไซม์โปรตีเอส แอลฟาอะไมเลส และอะไมโลกลูโคซิเดส ย่อยโครงสร้างแป้งให้เป็นน้ำตาล จากนั้นหมักแอลกอฮอล์ด้วย *Saccharomyces cerevisiae* ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และหมักกรดอะซิติกโดยใช้แอลกอฮอล์เริ่มต้นร้อยละ 10 ปริมาตรต่อปริมาตร ทำการหมักจนกระทั่งแอลกอฮอล์ลดลงเหลือระหว่างร้อยละ 1-0.5 (128 ชั่วโมง) ได้ปริมาณกรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 5.82 น้ำหนักต่อปริมาตร แต่อย่างไรก็ตามในการทดลองดังกล่าวพบว่าการใช้เอนไซม์หลายชนิด ซึ่งอาจจะส่งผลให้ราคาต้นทุนในการผลิตน้ำส้มสายชูสูงขึ้นได้แม้จะใช้วัตถุดิบที่มีราคาต่ำ ในประเทศไทยมีการผลิตสุราหมักพื้นบ้าน “สาโท” ซึ่งมีการใช้ข้าวเป็นวัตถุดิบในการหมักเพื่อให้ได้แอลกอฮอล์มีความน่าสนใจ เนื่องจากเป็นการใช้หัวเชื้อผสมอย่างถูกแบ่ง ซึ่งประกอบไปด้วย รา และ ยีสต์ ในการหมักเพื่อให้เชื้อจุลินทรีย์ทำการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลและเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ ด้วยกระบวนการดังกล่าวทำให้ไม่ต้องใช้เอนไซม์ทางการค้า

ซึ่งสามารถช่วยลดต้นทุนในการผลิตได้เป็นอย่างดี (Siripok, 2007) คล้ายคลึงกับการทำน้ำส้มสายชูข้าวในญี่ปุ่นที่เริ่มต้นด้วยการผลิตข้าวโคจิจากการใช้เชื้อรา *Aspergillus oryzae* เพื่อย่อยแป้งในข้าวให้เป็นน้ำตาล และใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* เพื่อหมักน้ำตาลให้กลายเป็นแอลกอฮอล์ แอลกอฮอล์ที่ได้จะถูกหมักโดยแบคทีเรีย *Acetobacter aceti* เพื่อเปลี่ยนแอลกอฮอล์เป็นกรดอะซิติก (Kudpeng et al., 2016; Sornsanit et al., 2022)

ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากรำข้าวละเอียดโดยการประยุกต์ความรู้จากการหมักสาโทโดยใช้ลูกแป้งเป็นหัวเชื้อ แทนการใช้เอนไซม์ทางการค้า เพื่อลดต้นทุนในการผลิตเพิ่มมูลค่าให้กับรำข้าวละเอียดแล้ว ยังเป็นการช่วยลดรำข้าวตกค้างจากกระบวนการสีข้าว ลดของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตร และเป็นการส่งเสริมการใช้ทรัพยากรธรรมชาติหมุนเวียนอย่างยั่งยืน สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชูจากวัตถุดิบข้าวหรือผลิตภัณฑ์พลอยได้จากข้าวชนิดอื่น ๆ ต่อไป

วิธีการศึกษา

1. การเตรียมวัตถุดิบ

รำข้าวละเอียด (ข้าวหอมมะลิ) ได้รับความอนุเคราะห์จาก บริษัท เอเซีย โกลเด้นไรซ์ จำกัด จังหวัดฉะเชิงเทรา เกิดจากกระบวนการขัดมัน (polisher) เมล็ดข้าวสาร จากข้าวหอมมะลินีนาเขตพื้นที่ภาคกลางของประเทศไทย นำมาทำความสะอาดคัดแยกสิ่งปนเปื้อนออก (ซากแมลง เมล็ดข้าว เปลือกข้าว เศษหิน) โดยการนำรำข้าวไปร่อนผ่านตะแกรงเบอร์ 7 (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.70 มิลลิเมตร) ก่อนนำมาใช้ในการทดลอง (องค์ประกอบทางเคมีของรำข้าวละเอียด เป็นการวิเคราะห์โดยบริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด ได้แก่ ปริมาณเถ้า (AOAC, 2023), ปริมาณไขมัน (AOAC, 2023), ปริมาณความชื้น (AOAC, 2023), โปรตีน (AOAC, 2023) และ ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (AOAC, 1993)

2. การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักแอลกอฮอล์จากรำข้าวละเอียด

นำรำข้าวละเอียด 500 กรัม ไปนึ่งบนไอน้ำเดือด เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาพักไว้จนอุณหภูมิรำข้าวต่ำกว่า 50 องศาเซลเซียส ซึ่งลูกแป้งสาโท 5 กรัม (ตรามงกุฏ, นนทบุรี) ผสมกับรำข้าวให้ทั่ว แล้วทำการบรรจุลงในโถแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน (Cheirsilp et al., 2023) จากนั้นทำการทดลองเปรียบเทียบ 4 สภาวะ คือ

1) เติมน้ำสะอาดปริมาตร 1 ลิตร จากนั้นเติมน้ำต้มสุกที่เย็นแล้วปริมาตร 10 มิลลิลิตร (สภาวะควบคุม)
 2) เติมน้ำสะอาดปริมาตร 1 ลิตร จากนั้นชั่งยีสต์ผงแห้ง (active dry yeast: *Saccharomyces cerevisiae*: new aule) 0.50 กรัม ละลายในน้ำต้มสุกอุณหภูมิประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (เป็นระยะเวลานาน 10 นาที) เติมน้ำลงในโถแก้ว

3) เติมน้ำตาลทรายขาวที่ความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 1 ลิตร จากนั้นเติมน้ำต้มสุกที่เย็นแล้วปริมาตร 10 มิลลิลิตร

4) เติมน้ำตาลทรายขาวที่ความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 1 ลิตร จากนั้นชั่งยีสต์ผงแห้ง 0.50 กรัม ละลายในน้ำต้มสุกอุณหภูมิประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (เป็นระยะเวลานาน 10 นาที) เติมน้ำลงในโถแก้ว

ทำการหมักต่ออีกเป็นระยะเวลา 3 วัน โดยเก็บตัวอย่างทุก ๆ 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณแอลกอฮอล์ ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด และค่าพีเอช ตามวิธีดังต่อไปนี้

การวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ : ปริมาณแอลกอฮอล์เป็นการวัดโดยใช้เครื่อง Ebulliometer (Per Vinum J. Salleron Dujardin; France) โดยการหาจุดเดือดของน้ำกลั่นเปรียบเทียบกับจุดเดือดของน้ำหมัก โดยอ่านค่าปริมาณ

แอลกอฮอล์ในหน่วยร้อยละปริมาตรต่อปริมาตร ผ่านแผ่นอ่านค่าแอลกอฮอล์ โดยเลื่อนอุณหภูมิที่เป็นจุดเดือดของน้ำกลั่นให้ตรงกับค่า 0 ของปริมาณแอลกอฮอล์ จากนั้นเมื่อได้อุณหภูมิคงที่ของตัวอย่างน้ำหมัก (จุดเดือด) ให้อ่านค่าอุณหภูมิที่ตรงกับค่าปริมาณแอลกอฮอล์ จากนั้นบันทึกผลการทดลอง

การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลาย : ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเป็นการวัดโดยการใช้อุปกรณ์ Hand refractometer (ATAGO; Japan) โดยทำการดูดสารละลายหยดลงบนแผ่นปริซึม 1 หยด ปิดแผ่นกันแสง (ระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ) อ่านค่าที่รอยตัดของพื้นที่โปร่งแสงและพื้นที่สีฟ้าผ่านทางเลนส์ใกล้ตา (eye-piece) ในจุดที่มีแสง จากนั้นบันทึกผลการทดลอง

การวิเคราะห์ค่าพีเอช : ค่าพีเอชหรือค่าความเป็นกรดต่างเป็นการวัดโดยใช้เครื่องวัดพีเอช (pH700; Eutech instruments; Singapore)

3. การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักน้ำส้มสายชู

3.1 การเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรียสำหรับผลิตน้ำส้มสายชู

เชื้อ *Acetobacter acetii* TISTR1053 (จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย: วว.) นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Glucose Yeast Extract Broth (GYEB) ประกอบด้วย น้ำตาลกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร สารสกัดจากยีสต์ 10 กรัมต่อลิตร แบ่งใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติม เติมแคลเซียมคาร์บอเนต (ที่ฆ่าเชื้อแล้ว) 0.50 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร (Punyanunt et al., 2021; Krongkeha, 2024)

ศึกษากระบวนการเจริญโดยการถ่ายเชื้อลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYEB นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก ๆ 24 ชั่วโมง นำมาหาจำนวนโคโลนี (total plate count) โดยเจือจางแบบเป็นลำดับส่วน (serial dilution) ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.85 กรัมกระจายเชื้อลงในอาหาร Glucose Yeast Extract Agar (GYEA) (ทำการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับ GYEB โดยทำการเติมผงวุ้นลงไป 15 กรัมต่อลิตร) (Punyanunt et al., 2021; Krongkeha, 2024)

กล้าเชื้อ *A. acetii* TISTR1053 เป็นการเตรียมในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYEB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน (OD_{600} ในช่วง 0.8-1.0) ก่อนนำไปใช้เป็นเชื้อตั้งต้นในการศึกษาขั้นตอนต่อไป

3.2 การหมักน้ำส้มสายชู

ทำการหมักน้ำส้มสายชูโดยนำแอลกอฮอล์ที่ได้จากการหมักข้าว มากรองผ่านผ้าขาวบาง (ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว) 2 ชั้น บรรจุลงในโถแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นเติมกล้าเชื้อ *A. acetii* TISTR1053 ลงไปในโถแก้วปริมาตร 10% (v/v) ทำการศึกษา 2 สภาวะ คือ

- 1) สภาวะให้อากาศ โดยให้อากาศที่ 4 vvm ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน
- 2) สภาวะไม่ให้อากาศ ปิดด้วยผ้าขาวบาง (ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว) 2 ชั้น วางไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 14 วัน

ทำการเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการวิเคราะห์หาปริมาณแอลกอฮอล์ ค่าพีเอช และค่าของแข็งที่ละลาย ด้วยวิธีเดียวกับการศึกษาในขั้นตอนที่ 2 และวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะซิติกที่ได้จากกระบวนการหมักโดยนำน้ำหมักน้ำส้มสายชูมา 1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาณ 9 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นหยดสารละลายฟีนอล์ฟทาลีนเข้มข้นร้อยละ 1 ลงไปจำนวน 2 หยด เขย่าให้เข้ากัน นำไปไทเทรตกับสารละลาย

โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ระดับความเข้มข้น 0.10 นอร์มอล (NaOH 0.1 N) จนกระทั่งถึงจุดยุติ (สารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพู) นำปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไปคำนวณหาปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติก ดังสมการ (1) (AOAC, 2023)

$$\text{ร้อยละน้ำหนักต่อปริมาตรของกรดอะซิติก} = (C \times V \times MW \times 100 / 1,000 \times 10) / 10 \quad (1)$$

เมื่อ C = ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

V = ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ (มิลลิลิตร)

MW = น้ำหนักโมเลกุลของกรดอะซิติก

4. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ผลการทดลองเป็นการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ จากนั้นนำมาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ด้วยโปรแกรม SPSS v.23 (IBM) เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามวิธีการวิเคราะห์แบบ Duncan's multiple rang test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$)

ผลการศึกษาและอภิปรายผล

1. องค์ประกอบของรำข้าวละเอียด

รำข้าวละเอียดมีองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญ ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน กรดอะมิโน ไขมัน แร่ธาตุ วิตามิน และเอนไซม์ โดยในรำข้าวส่วนใหญ่นั้น จะมีโปรตีน ไขมัน โยอาหาร และเถ้า ซึ่งคุณสมบัติทางเคมีของรำข้าวดังกล่าวนี้ ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ สภาพที่ใช้ในการเพาะปลูก กระบวนการขัดสี เป็นต้น (Wongsa et al., 2025) จากการวิเคราะห์คุณสมบัติของรำข้าวละเอียดที่ได้จากบริษัท เอเซีย โกลเด้นไรซ์ จำกัด, จังหวัดฉะเชิงเทรา พบว่า ประกอบไปด้วย โปรตีน 17.17, ไขมัน 12.72, คาร์โบไฮเดรต 53.01, ความชื้น 11.18 และเถ้า 5.92 กรัมต่อรำข้าวละเอียด 100 กรัม ดัง (Table 1)

Table 1 Comparison of proximate composition of fine rice bran.

mass fraction for each component (%w/w)					references
protein	fat	carbohydrate	moisture	ash	
17.17	12.72	53.01	11.18	5.92	this study [*]
16.75	1.88	68.65	-	12.72	Pazuch et al., (2020) ^{**}
13.10	20.30	33.80	8.52	9.90	Moreira et al., (2023)
12.10	17.70	20.90	6.50	9.40	Li et al., (2023)
13.00	17.90	41.30	11.20	10.00	Massarolo et al., (2016)

^{*} Analysis by Central Laboratory (Thailand) Co., Ltd.

^{**} defatted rice bran (DRB)

จาก (Table 1) พบว่า องค์ประกอบของรำข้าวละเอียด มีความแปรปรวนขึ้นอยู่กับ แหล่งวัตถุดิบ วิธีการผลิต และกระบวนการแปรรูป ซึ่งส่งผลต่อปริมาณสารอาหารแต่ละชนิดอย่างมีนัยสำคัญ โดยองค์ประกอบหลักที่แตกต่างกันอย่างชัดเจนระหว่างรำข้าวแต่ละแหล่ง คือ ปริมาณคาร์โบไฮเดรต ไขมัน และเถ้า ในขณะที่ปริมาณโปรตีนมีความแตกต่างไม่มากนักในช่วงประมาณร้อยละ 12-17 น้ำหนักต่อน้ำหนัก ตัวอย่างรำข้าวละเอียดจากงานวิจัยนี้ (ร้อยละ 17.17) มีปริมาณโปรตีนสูงสุด รองลงมาคือข้อมูลจาก Pazuch et al., (2020) (ร้อยละ 16.75) ในขณะที่ปริมาณคาร์โบไฮเดรตอยู่ในช่วงร้อยละ 20.90-68.65 น้ำหนักต่อน้ำหนัก Pazuch et al., (2020) รายงานปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงสุดถึงร้อยละ

68.65 ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการสกัดไขมันออกก่อนหน้านี้ ในขณะที่ Li et al., (2023) รายงานต่ำสุดเพียงร้อยละ 20.90 นอกจากนี้ยังพบว่างานวิจัยนี้ (ร้อยละ 53.01) มีคาร์โบไฮเดรตในระดับค่อนข้างสูง เป็นปัจจัยสำคัญที่สามารถนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับกระบวนการหมัก

ตัวอย่างรำข้าวละเอียดจากงานวิจัยนี้ มีความโดดเด่นในด้านปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่สูง (ร้อยละ 53.01) และโปรตีน (ร้อยละ 17.17) ซึ่งเหมาะสมต่อการนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนสำหรับกระบวนการหมักจุลินทรีย์เพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ชีวภาพ เช่น น้ำส้มสายชู หรือ แอลกอฮอล์ ค่าความชื้นและเถ้าในระดับปานกลางถึงต่ำ ช่วยลดความเสี่ยงของการปนเปื้อนและเพิ่มเสถียรภาพของวัตถุดิบในการเก็บรักษาและกระบวนการหมัก

2. การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักแอลกอฮอล์จากรำข้าวละเอียด

กระบวนการหมักแอลกอฮอล์จากรำข้าวละเอียดเป็นกระบวนการเช่นเดียวกับที่ใช้ในการหมักสาโทจากข้าว โดยกรรมวิธีในการหมักสาโทนั้น คือ การหมักข้าวด้วยเชื้อราและเชื้อยีสต์ หรือลูกแป้ง (หัวเชื้อที่ผสมทั้งเชื้อราและยีสต์) เพื่อเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลซึ่งหมักไว้ระยะเวลาหนึ่ง จากนั้นเติมน้ำสะอาดในอัตราส่วนที่เหมาะสม (อาจมีการเติมน้ำตาลเพื่อให้สภาวะในการหมักเหมาะสม) หมักต่ออีกระยะเวลาหนึ่งเพื่อให้ได้ปริมาณแอลกอฮอล์ตามต้องการ (Danwiruthai & Laopaiboon, 2006) จากการทดลองเติมยีสต์ *S. cerevisiae* (สภาวะที่ 2) หลังการผ่านน้ำเมื่อหมักรำข้าวเป็นเวลา 3 วัน พบว่าปริมาณแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้นจากสภาวะไม่เติมยีสต์ (สภาวะที่ 1) อย่างไรก็ตามยังพบว่าในสภาวะที่ไม่เติมยีสต์นั้นสามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้ร้อยละ 2.00±0.20 ปริมาตรต่อปริมาตร (Table 2) ทั้งนี้เนื่องจากในลูกแป้งนั้นมีจุลินทรีย์หลากหลายชนิดทั้ง เชื้อรา ยีสต์ และแบคทีเรีย (Kanlyakrit & Boornasawettatham, 2005) ยีสต์ที่พบในลูกแป้งส่วนใหญ่คือ *Saccharomycopsis fibuligera* โดยเชื้อยีสต์ชนิดนี้มีความสามารถในการย่อยแป้งได้ดีที่สุด แต่อย่างไรก็ตามกลับพบว่ามีความสามารถในการผลิตแอลกอฮอล์ได้น้อยที่สุด (Limtong et al., 2002) ดังนั้นการเติมยีสต์ *S. cerevisiae* จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการหมักมากยิ่งขึ้น เนื่องจากยีสต์สายพันธุ์นี้สามารถทนต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมได้ดีกว่ายีสต์สายพันธุ์อื่น ๆ (Limtong, 2006) นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้เริ่มต้นมีเพียง 5.10 องศาบริกซ์ (วัดปริมาณของแข็งที่ละลายหลังการผ่านน้ำ) ดังนั้นปริมาณแอลกอฮอล์ที่ได้เมื่อมีการเติมยีสต์ลงไปจึงสูงสุดเพียงร้อยละ 4.97±0.25 ปริมาตรต่อปริมาตร สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Kudpeng et al., (2016) พบว่า ข้าวเหนียวจะให้ปริมาณแอลกอฮอล์สูงกว่าข้าวเจ้า โดยพบว่าข้าวเจ้า (ข้าวหอมมะลิ 105 ข้าวไรซ์เบอร์รี่ และ ข้าวหอมนิล) มีปริมาณของแข็งที่ละลายอยู่ที่ 5.60-6.00 องศาบริกซ์ กล่าวได้ว่ารำข้าวละเอียดจากรำข้าวหอมมะลิที่ใช้ในการศึกษานี้มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับข้าวเจ้าเมื่อนำไปผ่านกระบวนการหมักโดยใช้ลูกแป้ง

Table 2 Alcohol production of differential fine rice bran fermentation conditions.

conditions	alcohol content (%v/v)	pH
1 (FRB)***	2.00±0.20 ^d	4.00±0.00 ^a
2 (FRB+yeast)	4.97±0.25 ^c	3.35±0.03 ^c
3 (FRB+sucrose)	7.40±0.79 ^b	4.00±0.00 ^a
4 (FRB+sucrose+yeast)	9.90±0.36 ^a	3.55±0.02 ^b

* mean and standard deviation of triplicate samples

** value with different superscript letter (a-d) are significantly different according to the statistical analysis Duncan's multiple rang test (p<0.05).

*** FRB=fine rice bran

เมื่อทำการเติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ลงไปหลังจากทำการหมักรำข้าวละเอียดเป็นเวลา 3 วัน (สภาวะที่ 3 และ 4) พบว่า มีปริมาณของแข็งที่ละลายเริ่มต้น 16 องศาบริกซ์ เมื่อทำการศึกษาภายใต้สภาวะที่ไม่เติมยีสต์ (สภาวะที่ 3) และเติมยีสต์ *S. cerevisiae* (สภาวะที่ 4) พบว่า ผลการทดลองเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับ 2 สภาวะที่กล่าวไปแล้วข้างต้น กล่าวคือเมื่อเติมยีสต์ลงไปจะช่วยเร่งการผลิตแอลกอฮอล์ได้ปริมาณสูงกว่าสภาวะที่ไม่เติมยีสต์ร้อยละ 34 (Table 2) การเติมหัวเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* บริสุทธิ์ลงไปนั้นนอกจากจะเป็นการเร่งการเกิดปฏิกิริยาการหมักแล้ว ยังสามารถช่วยในการควบคุมคุณภาพของสาโทที่ได้จากการผลิตให้คงที่ได้ตามมาตรฐาน จากการรายงานของ Srismatthakarn & Rauhut (2020) พบว่าการเติมเชื้อยีสต์บริสุทธิ์ช่วยให้เกิดสารกลิ่นหอมสูง และสารจับ SO_2 ต่ำ ทำให้ได้ไวน์ที่มีกลิ่นรสดี นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก (หลังผ่านน้ำเป็นเวลา 3 วัน) สภาวะที่เติมยีสต์มีค่าพีเอชต่ำกว่าสภาวะที่ไม่เติมยีสต์ ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของยีสต์ ค่าความเป็นกรดที่ได้สอดคล้องกับการทดลองของ Somsanit et al., (2022) พบว่า สภาวะที่สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้เพิ่มขึ้นก็จะมีค่าพีเอชลดต่ำลง นอกจากนี้ Cheirsilp et al., (2023) ยังพบว่าในกระบวนการหมักสาโทจากข้าวที่มีสีต่างกันค่า pH สุดท้ายอยู่ในช่วง 3.35-4.30 ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าในช่วงวันแรกของการหมัก เชื้อราที่สร้างเอนไซม์อะไมเลสมีส่วนช่วยในการสังเคราะห์กรดอินทรีย์ส่งผลให้ค่า pH ของ ผลิตภัณฑ์แอลกอฮอล์ในการศึกษานี้มีค่าเป็นกรด นอกจากนี้ การเกิดกรดคาร์บอนิกจากปฏิกิริยาระหว่างแอลกอฮอล์และคาร์บอนไดออกไซด์กับน้ำที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการหมัก อาจเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อค่า pH ที่ค่อนข้างเป็นกรดของผลิตภัณฑ์แอลกอฮอล์ (dela Rosa & Medina, 2022) หรืออาจจะเกิดจากสารประกอบฟีนอลิกที่เป็นกรดในชั้นของรำข้าวที่อาจถูกปล่อยออกมาในระหว่างกระบวนการหมักได้ (Cheirsilp et al., 2023)

3. การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักน้ำส้มสายชูจากรำข้าวละเอียด

แบคทีเรียอะซิติก (acetic acid bacteria) เป็นจุลินทรีย์ที่อยู่ในตระกูล Acetobacteraceae มีคุณสมบัติในการผลิตกรดน้ำส้มสายชูหรือกรดอะซิติกจากแอลกอฮอล์ ในการทดลองนี้เป็นการใช้เชื้อ *Acetobacter aceti* TISTR1053 มาใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชูจากรำข้าวละเอียด

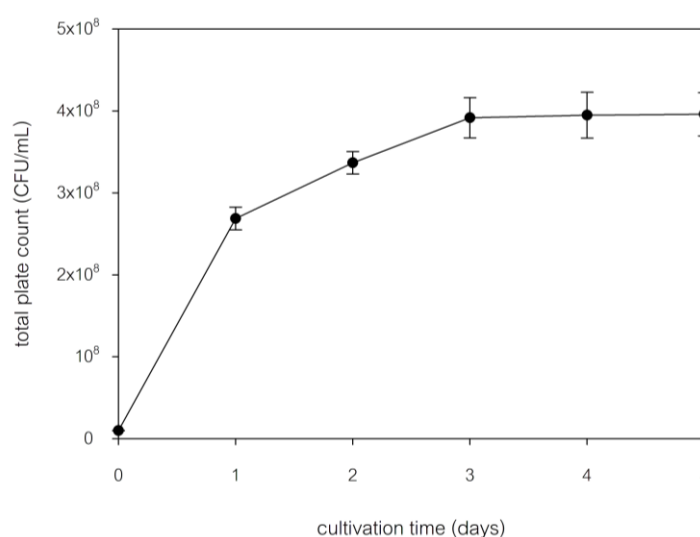


Figure 1 Time course of *Acetobacter aceti* TISTR1053 growth curve.

จากการศึกษาระยะการเจริญเติบโต พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *A. aceti* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYEB เชื้อมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 1-3 วัน โดยเชื้อมีอัตราการเจริญสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน

มีจำนวนแบคทีเรีย 3.9×10^8 CFU/mL จากนั้นเชื้อเข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) จนถึงวันที่ 5 ของการเจริญ (Figure 1) สอดคล้องกับการทดลองของ Punyanunt et al., (2021) พบว่าแบคทีเรียน้ำส้มสายชู *A. pasteurianus* ในอาหาร GYEB วันที่ 3 มีการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียน้ำส้มสายชูอยู่ในระดับ 10^8 CFU/mL คงที่จนถึงวันที่ 5 ดังนั้นระยะเวลาที่เหมาะสมของ *A. aceti* คือระยะเวลาที่อยู่ในช่วง 2-3 วัน มีจำนวนสูงสุดเพียงพอที่จะนำไปศึกษาในการผลิตน้ำส้มสายชูต่อไป

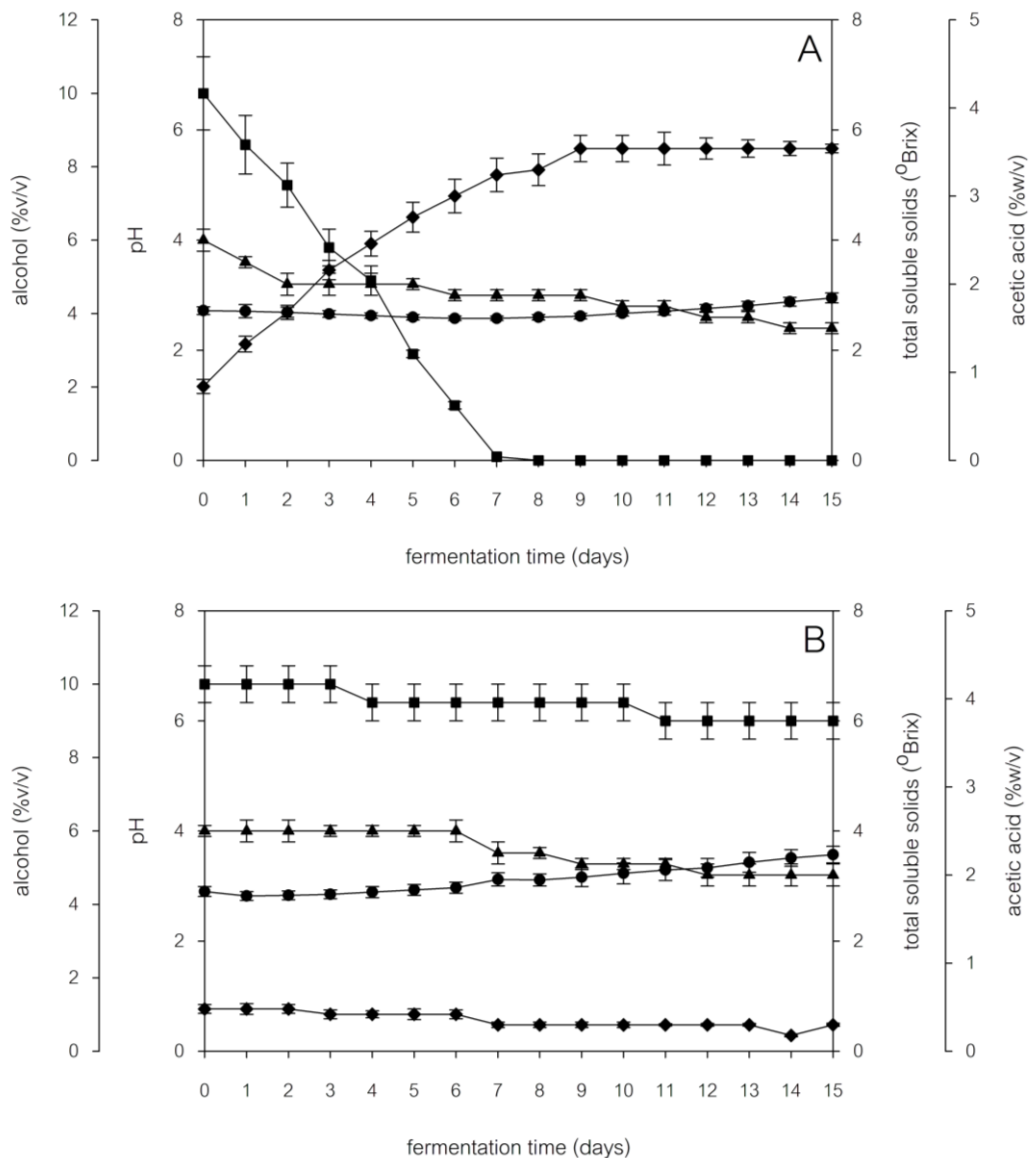


Figure 2 Effect of aerobic fermentation (A) and anaerobic fermentation (B) on the production of pH (●), alcohol content (■), total soluble solids (▲), and acetic acid (◆) of *Acetobacter aceti* TISTR1053.

เมื่อทำการหมักน้ำส้มสายชู 2 สภาวะ คือ สภาวะให้อากาศ (Figure 2A) และสภาวะไม่ให้อากาศ (Figure 2B) พบว่าสภาวะให้อากาศมีการเปลี่ยนแปลงอย่างเห็นได้ชัด ในขณะที่สภาวะไม่ให้อากาศมีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นน้อยมาก ตลอดระยะเวลาการหมักทั้ง 15 วัน ทั้งนี้เป็นผลเนื่องมาจากเชื้อแบคทีเรีย *A. aceti* เป็นแบคทีเรียชนิดต้องการอากาศ ในการเจริญเติบโต เมื่อเชื้อมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วจึงทำให้อัตราการใช้สารตั้งต้น (แอลกอฮอล์) และอัตราการผลิต กรดอะซิติกเพิ่มขึ้นด้วย จากการทดลองให้อากาศ (Figure 2A) พบว่าเชื้อใช้แอลกอฮอล์หมด เมื่อทำการหมักเป็นเวลา

7 วัน และผลิตรถอะซิติกสูงสุดที่ระยะเวลา 9 วัน โดยสามารถผลิตได้สูงสุดที่ร้อยละ 3.60 ± 0.06 น้ำหนักต่อปริมาตร สอดคล้องกับการทดลองของ Taweekasemsombut et al., (2021) พบว่าข้าวหอมมะลิขัดสีสามารถผลิตรถอะซิติกได้สูงสุดร้อยละ 3.78 ± 0.18 น้ำหนักต่อปริมาตร ในขณะที่ข้าวเหนียวสามารถผลิตรถอะซิติกได้ร้อยละ 4-6 น้ำหนักต่อปริมาตร นั้นเป็นเพราะข้าวเหนียวมีโครงสร้างของแป้งแบบอะไมโลเพกตินมากกว่าข้าวเจ้าทำให้สามารถเปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์ได้มากกว่าและปริมาณแอลกอฮอล์มากก็จะสามารถเปลี่ยนเป็นกรดอะซิติกได้มากขึ้นเช่นกัน (Sirikhansaeng et al., 2020)

ในขณะเดียวกันสภาวะไม่ให้อากาศมีปริมาณกรดอะซิติกสูงสุดเพียงร้อยละ 0.48 ± 0.00 น้ำหนักต่อปริมาตรและพบว่า อัตราการเปลี่ยนแปลงของสารตั้งต้นของสภาวะไม่ให้อากาศนั้นดำเนินการไปค่อนข้างช้า (Figure 2B) สอดคล้องกับการทดลองของ Sirikhansaeng et al., (2020) พบว่า เชื้อ *A. pasteurianus* TISTR102 สามารถเปลี่ยนแอลกอฮอล์ให้เป็นกรดอะซิติกได้ร้อยละ 0.48 น้ำหนักต่อปริมาตร (4.76 กรัมต่อลิตร) เมื่อทำการหมักน้ำส้มสายชูจากสาโทข้าวเหนียว กข.6 ในสภาวะนิ่งเป็นระยะเวลา 3 วัน ดังนั้นในการผลิตน้ำส้มสายชูควรจะทำการหมักภายใต้สภาวะให้อากาศจะทำให้เชื้อแบคทีเรียสามารถเปลี่ยนแอลกอฮอล์ให้เป็นกรดอะซิติกได้รวดเร็วกว่าและมีประสิทธิภาพสูงกว่าสภาวะไม่ให้อากาศ

สรุป

รำข้าวละเอียดยี่สิบห้าปีนำมาใช้ในงานวิจัยนี้มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงถึงร้อยละ 53.01 ซึ่งมากพอที่จะนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนให้กับจุลินทรีย์ผ่านกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพ เมื่อนำรำข้าวที่ได้มาผ่านกระบวนการผลิตแอลกอฮอล์พบว่า ให้ปริมาณแอลกอฮอล์สูงสุดคือ ร้อยละ 9.90 ± 0.36 ปริมาตรต่อปริมาตร โดยได้จากสภาวะที่มีการเติมน้ำตาลลงไป ร้อยละ 10 และยีสต์ในขั้นตอนการผ่านน้ำ (สภาวะที่ 4) แตกต่างจากสภาวะอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) นอกจากนี้ ยังพบว่าสภาวะที่ไม่มีการเติมน้ำตาลเพิ่มเติม แต่มีการเติมยีสต์ในขั้นตอนการผ่านน้ำก็สามารถเพิ่มปริมาณแอลกอฮอล์ได้ดีกว่าการหมักด้วยลูกแป้งเพียงอย่างเดียว สะท้อนให้เห็นถึงบทบาทสำคัญของ *S. cerevisiae* ในการเร่งกระบวนการเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเมื่อผลิตกรดแอลกอฮอล์ที่ได้ถูกนำไปผ่านกระบวนการหมักน้ำส้มสายชู โดยใช้ *Acetobacter aceti* TISTR 1053 พบว่า สภาวะที่ให้อากาศอย่างต่อเนื่องสามารถเร่งอัตราการเปลี่ยนแปลงแอลกอฮอล์เป็นกรดอะซิติกได้อย่างรวดเร็ว โดยให้ผลผลิตน้ำส้มสายชูเข้มข้นสูงสุดที่ร้อยละ 3.60 ± 0.06 น้ำหนักต่อปริมาตร ในวันที่ 9 ของกระบวนการหมัก ในขณะที่สภาวะไม่ให้อากาศกลับให้ปริมาณน้ำส้มสายชูเพียงร้อยละ 0.48 ± 0.00 น้ำหนักต่อปริมาตร เท่านั้น ซึ่งชี้ให้เห็นว่าสภาวะที่อากาศไหลเวียนมีบทบาทสำคัญอย่างยิ่งต่อการกระตุ้นการทำงานของ *A. aceti* ในการสังเคราะห์กรดอะซิติกจากแอลกอฮอล์ จากผลการวิจัยดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า รำข้าวละเอียดยี่สิบห้าปีคุณภาพสูงในการนำมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตน้ำส้มสายชูเชิงอุตสาหกรรม เนื่องจากเป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่มีองค์ประกอบทางโภชนาการเหมาะสมต่อการหมักของจุลินทรีย์ ทั้งในขั้นตอนของการผลิตแอลกอฮอล์และกรดอะซิติก โดยเฉพาะในสภาวะที่มีการเติมน้ำตาลและควบคุมสภาพแวดล้อมให้เหมาะสม จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพและปริมาณผลผลิตได้อย่างชัดเจน การนำรำข้าวมาเพิ่มมูลค่าในลักษณะดังกล่าวจึงเป็นแนวทางที่น่าสนใจ ทั้งในด้านเศรษฐกิจและสิ่งแวดล้อม และสามารถต่อยอดไปสู่การพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพและอุตสาหกรรมหมักชีวภาพในอนาคตได้อย่างยั่งยืน

คำขอบคุณ

ผู้เขียนขอขอบคุณบริษัท เอเซีย โกลเด้น ไรซ์ จำกัด จังหวัดฉะเชิงเทรา ที่เอื้อเฟื้อวัตถุดิบในงานวิจัย และขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก ในการสนับสนุนอุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- AOAC. (1993). Official methods of analysis of AOAC international (14th ed.). Association of Official Analytical Chemist, USA. http://lib3.dss.go.th/fulltext/scan_ebook/aoac_1993_v76_n2.pdf
- AOAC. (2023). Official methods of analysis of AOAC international (22nd ed.). Association of Official Analytical Chemist, USA. <https://www.aoac.org/official-methods-of-analysis>
- Cheirsilp, B., Satansat, J., Wanthong, K., Chaiyasain, R., Rakmai, J., Suwannarach, N., Kumla, J., Pathom-aree, W., Wang, G., & Srinuanpan, S. (2023). Bioprocess improvement for fermentation of pigmented Thai glutinous rice-based functional beverage (Sato) with superior antioxidant properties. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 50, 102701. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2023.102701>
- Danwiruthai, P., & Laopaiboon, P. (2006). *Fruit wine and sato: How to produce with confidence* (2nd ed.). Khlangnanavithaya Publisher. (in Thai)
- dela Rosa, J. G. L., & Medina, P. M. B. (2022). Philippine rice wine (*Tapuy*) made from *Ballatinao* black rice and traditional starter culture (*Bubod*) showed high alcohol content, total phenolic content, and antioxidant activity. *Food Science and Technology*, 42, 45120. <https://doi.org/10.1590/fst.45120>
- Ferronato, A. N., Rossi, R., Pinto, L. M. N., & Garavaglia, J. (2021). Development of a freeze-dried symbiotic obtained from rice bran. *Biotechnology Reports*, 30, e00636. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00636>
- Ho, C. W., Lazim, A. M., Fazry, S., Zaki, U. K. H. H., & Lim, S. J. (2017). Varieties, production, composition and health benefits of vinegars: A review. *Food Chemistry*, 221, 1621-1630. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.128>
- Kanauchi, M. (2013). *SAKE alcoholic beverage production in Japanese food industry* (pp. 39-63). IntechOpen. <http://dx.doi.org/10.5772/53153>
- Kanlyakrit, W., & Booranasawettatham, S. (2005). Identification of yeasts and molds isolated from Thai tradition fermentation starter (Lookpang) for sato industry. *Proceedings of 43rd Kasetsart University Annual Conference: Animals, Agro-Industry* (pp. 419-426). Bangkok: The Thailand Research Fund. https://kukr.lib.ku.ac.th/kukr_es/index.php?/BKN/search_detail/result/9371 (in Thai)
- Krongkeha, W. (2024). Screening and identification of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from Thai fermented meat products. *RMUTSB Academic Journal*, 12(2), 229-242. <https://li01.tci-thaijo.org/index.php/rmutsb-sci/article/view/262122> (in Thai)
- Kudpeng, C., Soemphol, W., & Tanamool, V. (2016). Study on production of sato from indigenous rice varieties in Nakhon Ratchasima. *Proceedings of The National and International Graduate Research Conference 2016* (pp. 371-380). Khon Kaen: Khon Kaen University, Thailand. <https://gsbooks.gs.kku.ac.th/59/ingrc2016/pdf/BMP1.pdf> (in Thai)
- Li, Y., Gao, C., Wang, Y., Fan, M., Wang, L., & Qian, H. (2023). Analysis of the aroma volatile compounds in different stabilized rice bran during storage. *Food Chemistry*, 405, 134753. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134753>

- Limtong, S., Sintara, S., Suwanarit, P., & Lotong, N. (2002). Yeast diversity in Thai traditional fermentation starter (Loog-pang). *Kasetsart Journal: Natural Science*, 36, 149-158. <https://www.thaiscience.info/journals/Article/TKJN/10974111.pdf>
- Limtong, S. (2006). *Yeast: Biodiversity and biotechnology*. Kasetsart University Publisher. (in Thai)
- Massarolo, K. C., de Souza, T. D., Ribeiro, A. C., Furlong, E. B., & de Souza Soares, L. A. (2016). Influence of cultivation *Rhizopus oryzae* on rice bran on lipid fraction: Fatty acids and phospholipids. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 8, 204-208. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.10.002>
- Moreira, B. P., Draszewski, C. P., Rosa, N. C., Tres, M. V., Zabot, G. L., Pereira, F. C., Abaide, E. R., & Castilhos, F. (2023). Integrated rice bran processing by supercritical CO₂ extraction and subcritical water hydrolysis to obtain oil, fermentable sugars, and platform chemicals. *The Journal of Supercritical Fluids*, 192, 105786. <https://doi.org/10.1590/2179-8087.042318>
- Nazir, N., Fiana, R. M., & Putra, D. P. (2019). Characteristics of black glutinous rice vinegar as traditionally fermented product of yeast *Tapai* and *Acetobacter aceti*. *Proceedings of IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 347(1), 012049. <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/347/1/012049/pdf>
- Pazuch, C. M., Kalschne, D. L., Siepmann, F. B., Marx, I. M. G., Oliveira, T. C. G. D., Spinosa, W. A., Canan, C., & Colla, E. (2020). Optimization and characterization of vinegar produced from rice bran. *Food Science and Technology*, 40(3), 608-613. <https://doi.org/10.1590/fst.13919>
- Punyanunt, S., Chalermpanyakorn, W., Phadungath, C., & MeunSritharam, L. (2021). Development of instant acetic acid bacteria model for pineapple cider production. *King Mongkut's Agricultural Journal*, 39(2), 141-147. <https://li01.tci-thaijo.org/index.php/agritechjournal/article/download/204051/171835/884480> (in Thai)
- Sangkod, U., Junrod, K., Aiamsaard, K., Thampitak, K., & Hwanhlem, N. (2021). Chemical characteristics of rice bran and its growth enhancement of probiotic *Pediococcus acidilactici* V202. *Naresuan Agricultural Journal*, 18(2), e0180203. <https://li01.tci-thaijo.org/index.php/aginujournal/article/view/251869/172850> (in Thai)
- Sirikhansaeng, P., Koedlap, J., & Nukadram, W. (2020). Glutinous rice fermented vinegar production from *Acetobacter pasteurianus* TISTR 102. *YRU Journal of Science and Technology*, 6(1), 1-9. <https://li01.tci-thaijo.org/index.php/yrjst/article/view/242310> (in Thai)
- Siripok, S. (2007). *Industrail microbiology*. Bangkok Software Technology House. (in Thai)
- Sornsanit, K., Arlai, A., & Riangmoo, A. (2022, July). Product development of fermented vinegar from Kluai Nam Wa. *Proceedings of the 14th NPRU National Academic Conference Nakhon Pathom Rajabhat University* (pp. 203-211). Nakhon Pathom: Nakhon Pathom Rajabhat University, Thailand. <https://publication.npru.ac.th/jspui/bitstream/123456789/1604/1/npru-24.pdf> (in Thai)
- Srismatthakarn, P., & Rauhut, D. (2020). Effect of different *Saccharomyces cerevisiae* strains and nutrients on the formation of SO₂-binding and aromatic compounds of Sauvignon blanc wines. *RMUTSB Academic Journal*, 8(1), 1-14. <https://li01.tci-thaijo.org/index.php/rmutsb-sci/article/view/241682> (in Thai)

- Taweekasemsombut, S., Tinoi, J., Mungkornasawakul, P., & Chandet, N. (2021). Thai rice vinegars: Production and biological properties. *Applied Sciences*, 11(13), 5929. <https://doi.org/10.3390/app11135929>
- Wongsa, P., Anantawa, V., Suthiluk, P., Seta, S., Naradisorn, M., Rawdkuen, S., & Shetty, K. (2025). Nutritional quality, volatile organic compounds and element compositions of indigenous upland rice. *Journal of Food Composition and Analysis*, 142, 107517. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2025.107517>