# บทที่ 3
# วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

## 3.1 วัสดุ

### 3.1.1 วัตถุดิบ

1) ข้าวเหนียวพันธุ์กข 6 กข 10 และสันป่าตอง 1 ซึ่งเป็นข้าวเปลือกจากศูนย์ขยายเมล็ดพันธุ์พืชที่ 7 จังหวัดเชียงใหม่ นำมาสีด้วยโรงสีข้าวขนาดครัวเรือน ได้เป็นข้าวสารเพื่อใช้ในการวิจัย

2) น้ำดื่ม จากบริษัทเชียงใหม่โพสตาร์ (1992) จำกัด

### 3.1.2 จุลินทรีย์

1) ยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisea* สายพันธุ์ทางการค้า

- Lalvin K1-V1116 Lalvin EC-1118 และ Enoferm BDX (LALLEMAND INC.)
- Fermivin PDM (DSM Food Specialties Beverage Ingredients)

2) ลูกแป้งสุรา

## 3.2 อุปกรณ์

### 3.2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ผลิตสุรากลั่น

1) หม้ออะลูมิเนียมตราจระเข้ ขนาด 38× 38 เซนติเมตร
2) ไม้พาย
3) กล่องโฟม ขนาด 458 × 607 × 315 มิลลิเมตร
4) ถังน้ำดื่มชนิดใส (PET) ขนาด 20 ลิตร
5) แอร์ล็อค (air lock)
6) เทอร์โมมิเตอร์
7) เครื่องชั่งแบบสปริง (ผลิตภายในประเทศ)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

8) เครื่องชั่งไฟฟ้า ทศนิยม 3 ตำแหน่ง (Precisa, XT 320M)

9) เตาแก๊ส

10) ชุดเครื่องกลั่นสุรา (ผลิตจากบริษัทห้างหุ้นส่วนจำกัดโคราชทรีท เคมิคอล)

**3.2.2 อุปกรณ์ที่ใช้วิเคราะห์คุณภาพ**

1) เวอร์เนียร์ คาร์ลิปเปอร์ (Vernier carliper) (Tricle Bramd 0-150mm ,0.6 in.)

2) เครื่องชั่งไฟฟ้า ทศนิยม 3 ตำแหน่ง (Precisa, XT 320M)

3) เครื่องชั่งไฟฟ้า ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius, Model A Germany)

4) ตู้อบลมร้อน (Hot air oven, Model ULM 500)

5) กระป๋องอบความชื้น (Moisture can)

6) ชุดวิเคราะห์ไขมัน (Soxhlet apparatus)

7) ชุดวิเคราะห์โปรตีน (Buchi, Model 323)

8) pH meter (Hanna instrument, Model HI 9321)

9) เตาไฟฟ้า (Heidolph MR 3001, Germany)

10) เครื่องวัดปริมาณแอลกอฮอล์ (Ebuliometer)

11) ไฮโดรมิเตอร์ ชนิดวัดปริมาณแอลกอฮอล์ ในช่วง 0-100 เปอร์เซ็นต์

12) เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (Hand Refractometer, ATAGO)

13) เครื่องแก้ว ได้แก่ ขวดรูปชมพู่ (Pyrex, USA) บีกเกอร์ (Pyrex, USA) บิวเรต (Witeg, Germany) กระบอกตวง (Pyrex, USA) ปิเปต (Witeg, Germany)

14) ชุดกลั่นวิเคราะห์กรดระเหย

15) สเปคโตโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) (Thermo Spectroic, Model BIOMATE 5)

**3.3. สารเคมี**

1. Termamyl SC ; Food grade (Novozymes, Denmark)
2. SAN Super 360L ; Food grade (Novozymes, Denmark)
3. Sulfuric acid ; AR grade (Merck, Germany)
4. Hydrochloric acid ; AR grade (Merck, Germany)
5. Copper sulfate ; AR grade (Fisher Scentific)
6. Sodium hydroxide ; AR grade (Merck, Germany)
7. Zinc Acetate dihydrate ; AR grade (Ajax Finechem)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

8. Sodium potassium tartrate ; AR grade (Ajax Finechem)

9. Potassium Ferocyanide ; AR grade (Ajax Finechem)

10. Methylene blue ; AR grade (Fisher Scentific)

11. Phenolphtaline ; AR grade (Fisher Scentific)

**3.4 วิธีการทดลอง**

การศึกษาผลของเอนไซม์ พันธุ์ข้าวเหนียว และเชื้อยีสต์ต่อคุณภาพของสุรากลั่นชุมชน แบ่งการวิจัยออกเป็น 4 ขั้นตอน ดังนี้

**3.4.1 ศึกษาคุณภาพด้านกายภาพและเคมีของข้าวเหนียว**

ใช้ข้าวเหนียว 3 พันธุ์ คือ กข6 กข10 และสันป่าตอง 1 นำมาตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพและเคมี ดังนี้

- วัดขนาดเมล็ดข้าว โดยวัดความกว้างและความยาวของเมล็ดข้าว ด้วย Vernier caliper (AACC, 1977)

- ชั่งน้ำหนักเมล็ดข้าว 1,000 เมล็ด โดยใช้เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (AACC, 1977)

- ความชื้น โดยการอบที่ 105 องศาเซลเซียส (AOAC, 2000)

- โปรตีน ด้วย Semi-Kjedahl method โดยหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด และคูณกับ conversion factor ของข้าว คือ 5.95 (AOAC, 2000)

- ไขมัน ด้วยวิธีซอล์เลตโดยการสกัดด้วยตัวทำละลายไดเอทิลอีเทอร์ (Diethyl ether extract method ; AOAC, 2000)

- เถ้า โดยการอบที่ 550 องศาเซลเซียส (AOAC, 2000)

- คาร์โบไฮเดรต โดยอาศัยผลต่างระหว่าง 100 เปอร์เซ็นต์ กับผลรวมของเปอร์เซ็นต์ความชื้น, โปรตีน, ไขมัน และเถ้า (AOAC, 2000)

- ปริมาณอะไมโลส โดยวิธีการทำให้เกิดสี (colorimetric method) วัดสีที่เกิดขึ้นด้วย Spectrophotometer (Juliano,1971)

- ปริมาณแป้งโดยวิธี Phenol-sulfuric method (Dobois, 1956)

นำข้อมูลทางด้านคุณภาพจากข้าวเหนียวทั้ง 3 พันธุ์ เปรียบเทียบกัน โดยการทำการทดลอง 3 ซ้ำ วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design : CRD) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

**3.4.2 ศึกษาการใช้เอนไซม์อะไมเลสทางการค้าในการย่อยข้าวเหนียว แล้วหมักให้เกิดแอลกอฮอล์**

**3.4.2.1 ศึกษาผลของปริมาณข้าวเหนียวในส่วนผสมต่อคุณภาพของน้ำส่าหลังการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และกลูโคอะไมเลส แล้วหมักให้เกิดแอลกอฮอล์**

เตรียมส่วนผสมของข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 และน้ำสะอาด (น้ำดื่ม) ในอัตราส่วน 15, 20, 25, 30 และ35 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แช่นาน 6 ชั่วโมง และต้มให้สุก แล้วทำการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (Termamyl SC) ในปริมาณ 0.04 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักข้าวสารเหนียว และกวนผสม นำไปไว้ในกล่องโฟมเพื่อป้องกันการสูญเสียความร้อน ปล่อยไว้จนกระทั่งอุณหภูมิของผสมลดลงเป็น 65 องศาเซลเซียส แล้วทำการเติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (SAN super 360 L) ในปริมาณ 0.06 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักข้าวสารเหนียว กวนผสม และปล่อยให้ย่อยต่อในกล่องโฟม จนกระทั่งอุณหภูมิของผสมลดลงเป็น 35 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่าง และต้มในน้ำเดือดนาน 20 นาที (เพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์) แล้วกรองด้วยผ้าขาวบาง นำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ส่วนที่เหลือจากการเก็บตัวอย่างเติมเชื้อยีสต์ผงทางการค้า Fermivin PDM ปริมาณ 0.2 กรัมต่อลิตร และถ่ายน้ำส่าลงในถังหมัก ปิดฝาถังด้วย air lock ปล่อยให้ทำการหมักที่อุณหภูมิห้อง จนสิ้นสุดกระบวนการหมัก หลังสิ้นสุดการหมักทำการตรวจวิเคราะห์ผลดังนี้

- ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด ด้วย Hand refractometer
- ปริมาณแอลกอฮอล์ ด้วย Ebulliometer
- ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ด้วยวิธี Lane and Eynon (AOAC, 2000)

เปรียบเทียบคุณภาพต่างๆ โดยการทำการทดลอง 3 ซ้ำ วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design : CRD) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT)

**3.4.2.2 ศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่าง ต่อคุณภาพของผสมหลังการย่อยด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส แล้วหมักให้เกิดแอลกอฮอล์**

เมื่อได้ปริมาณข้าวเหนียวที่เหมาะสมใน ข้อ 3.4.2.1 แล้ว นำมาทำการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (Termamyl SC) (ทำเช่นเดียวกับข้อ 3.4.2.1) เมื่ออุณหภูมิของผสมลดลง 65 องศาเซลเซียส นำมาปรับความเป็นกรด-ด่าง 3 ระดับ คือ 4.5, 5.0 และ 5.5 ด้วย 1 N $H_2SO_4$ เพื่อเปรียบเทียบกับการไม่ปรับความเป็นกรด-ด่าง หลังจากนั้นทำการย่อยด้วยเอนไซม์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

กลูโคอะไมเลส (SAN super 360 L) และเติมยีสต์ (ทำเช่นเดียวกับข้อ 3.4.2.1 ) ปล่อยให้หมักในสภาพอุณหภูมิห้อง เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักทำการตรวจวิเคราะห์ผลดังนี้

- ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด โดยใช้ Hand refractometer
- ปริมาณแอลกอฮอล์ โดยใช้ Ebulliometer
- ความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้ pH meter
- ปริมาณกรดทั้งหมด ในรูปของกรดแลคติค โดยการไตเตรท (Iland, 1993)
- ปริมาณกรดระเหย ในรูปกรดอะซิติก โดยการกลั่น (Iland, 1993)
- ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ด้วยวิธี Lane and Eynon (AOAC, 2000)

เปรียบเทียบคุณภาพต่างๆ โดยการทำการทดลอง 3 ซ้ำ วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design : CRD) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT)

**3.4.2.3 ศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ต่อคุณภาพของผสมหลังการย่อยด้วยเอนไซม์แล้ว และคุณภาพของน้ำส่าหลังสิ้นสุดกระบวนการหมัก**

นำข้าวเหนียวในปริมาณที่เหมาะสม จากข้อ 3.4.2.1 มาทำการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (Termamyl SC) (ทำเช่นเดียวกับข้อ 3.4.2.1 ) และเมื่ออุณหภูมิของผสมลดลง 65 องศาเซลเซียส นำมาปรับความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสมจากข้อ 3.4.2.2 แล้วทำการย่อยด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (SAN super 360 L) ในระดับปริมาณของเอนไซม์ต่างๆ กัน คือ 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09 และ 0.10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักข้าวสารเหนียว หลังจากนั้นจึงเติมเชื้อยีสต์ (ทำเช่นเดียวกับข้อ 3.4.2.1 ) ปล่อยให้หมักในสภาพอุณหภูมิห้อง ในระหว่างการย่อยและการหมักทำการตรวจวิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับข้อ 3.4.2.2 ทุกๆ 3 วัน จนสิ้นสุดกระบวนหมัก

เปรียบเทียบคุณภาพต่างๆ โดยการทำการทดลอง 3 ซ้ำ วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design : CRD) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

**3.4.3 ศึกษาผลของพันธุ์ข้าวเหนียวที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลสแล้วหมักให้เกิดแอลกอฮอล์ด้วยเชื้อยีสต์สายพันธุ์ทางการค้า ต่อคุณภาพของสุรากลั่น**

นำข้าวเหนียว 3 พันธุ์ คือ กข6 กข10 และสันป่าตอง 1 ในปริมาณที่เหมาะสมจากข้อ ข้อ 3.4.2.1 และเชื้อยีสต์ทางการค้า 4 สายพันธุ์ คือ Lalvin K1- V1116, Enoferm BDX, Lalvin EC-1118 และ Fermivin PDM มาทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.4.2.1 โดยใช้ปริมาณเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.4.2.3 ในระหว่างการย่อยและการหมัก ทำการตรวจวิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับข้อ 3.4.2.2 ทุกๆ 3 วัน จนสิ้นสุดกระบวนหมัก

เปรียบเทียบคุณภาพต่างๆ โดยวางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD (Factorial in Completely Randomized Design) มี 3×4 Treatment Combination เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT)

เมื่อทำการคัดเลือกพันธุ์ข้าวเหนียว และสายพันธุ์ยีสต์ จากการเปรียบเทียบคุณภาพต่างๆ ของน้ำส่าที่เหมาะสมแล้ว จึงนำไปกลั่นด้วยเครื่องกลั่นแบบธรรมดา (pot still) ทำการเปรียบเทียบค่าต่างๆ ดังนี้

- ผลผลิตแอลกอฮอล์ที่ได้ (%v/w) = {ปริมาณแอลกอฮอล์ที่กลั่นได้ (มล.) / น้ำหนักของข้าวสารเหนียวที่ใช้ (กรัม)} × 100
- ปริมาณแอลกอฮอล์ที่กลั่นได้เทียบกับปริมาณน้ำส่า (%v/v) = {ปริมาตรแอลกอฮอล์ที่กลั่นได้ (มล.) / ปริมาตรแอลกอฮอล์ในน้ำส่าหลังการหมัก (มล.) }× 100
- ปริมาณแอลกอฮอล์ที่กลั่นได้เทียบกับปริมาณแป้ง (%v/w) = {ปริมาตรแอลกอฮอล์ที่กลั่นได้ (มล.) / น้ำหนักแป้งในข้าวสารเหนียวที่ใช้ (กรัม) } × 100
- ประสิทธิภาพในการผลิตแอลกอฮอล์เทียบกับทางทฤษฎี (%) = {ปริมาณแอลกอฮอล์ที่ได้จริง (%) / ปริมาณแอลกอฮอล์ที่ได้ตามทฤษฎี (%)} × 100

โดยการทำการทดลอง 3 ซ้ำ วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design : CRD) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT)

นำสุรากลั่นที่ได้มาปรับความแรงแอลกอฮอล์เป็น 40 ดีกรี หรือเปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (ภาคผนวก ข ) แล้วทดสอบคุณภาพทางด้านประสาทสัมผัส โดยวิธี Hedonic scaling test โดยใช้ผู้ทดสอบชิมที่ผ่านการฝึกฝน จำนวน 20 คน ทดสอบคุณภาพด้านความใส กลิ่น รสชาติ และการยอมรับรวม (ไพโรจน์, 2539) วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design : CRD) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

**3.4.4 การเปรียบเทียบการย่อยด้วยเอนไซม์ กับการใช้ลูกแป้งในการผลิตสุรากลั่น**

เมื่อได้พันธุ์ข้าวเหนียวและเชื้อยีสต์ที่เหมาะสมในการผลิตสุรากลั่น จากข้อ 3.4.3 แล้ว ทำการเปรียบเทียบกับการใช้ลูกแป้งในการผลิตสุรากลั่น โดยใช้พันธุ์ข้าวเหนียวที่เหมาะสมในการผลิตสุรากลั่นในข้อ 3.4.3 นำมาแช่น้ำ 6 ชั่วโมง นึ่งให้สุก แล้วนำข้าวเหนียวสุกล้างน้ำจนหมดความเหนียว และคลุกเคล้ากับลูกแป้งที่บดละเอียดเป็นผงแล้ว นำมาใส่ภาชนะที่เตรียมไว้ ทิ้งไว้ 7 วัน หลังจากนั้นเติมน้ำต้มสุกในอัตราส่วน 3 ต่อ 5 (ข้าวสารเหนียว 3 กิโลกรัมต่อน้ำสุก 5 ลิตร) ทิ้งไว้อีก 7 วัน หรือจนกระทั่งสิ้นสุดการหมัก ในระหว่างการหมักหลังจากการเติมน้ำแล้ว ทำการตรวจวิเคราะห์ผล เช่นเดียวกับข้อ 3.4.2.2 ทุกๆ 3 วัน (สุภมาส, 2544) เมื่อสิ้นสุดการหมักแล้วนำมาเปรียบเทียบกับคุณภาพต่างๆ ของน้ำส่าของสุรากลั่นที่เหมาะสม ในข้อ 3.4.3 เปรียบเทียบโดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ ทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Student ' t Test

นำน้ำส่าที่ได้จากการใช้ลูกแป้ง มาทำการกลั่นด้วยเครื่องกลั่นแบบธรรมดา (pot still) ทำการเปรียบเทียบกับสุรากลั่นที่เหมาะสมจากข้อ 3.4.3 ในด้านดังต่างๆ ได้แก่

- ผลผลิตแอลกอฮอล์ที่ได้ (%v/w)
- ปริมาณแอลกอฮอล์ที่กลั่นได้เมื่อเทียบกับปริมาณน้ำส่า (%v/v)
- ปริมาณแอลกอฮอล์ที่กลั่นได้เมื่อเทียบกับปริมาณแป้ง (%v/w)
- ประสิทธิภาพในการผลิตแอลกอฮอล์เมื่อเทียบกับทางทฤษฎี (%)
- ต้นทุนการผลิต

หลังจากนั้นนำสุรากลั่นทั้ง 2 ตัวอย่าง มาปรับความแรงแอลกอฮอล์เป็น 40 ดีกรี หรือเปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และตรวจวิเคราะห์หาปริมาณฟูเซลออยล์ (fusel oil) เฟอร์ฟิวรัล (furfural) เอสเทอร์ (ester) แอลดีไฮด์ (aldehyde) เมทิลแอลกอฮอล์ (methyl alcohol) เอทิลคาร์บาเมต (ethyl carbamate) ตะกั่ว (copper) และสารหนู (arsenic) จากสถานบริการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (สวท-มช.)

นำสุรากลั่นทั้ง 2 ตัวอย่าง มาทดสอบคุณภาพทางด้านประสาทสัมผัส โดยวิธี Hedonic scaling test โดยใช้ผู้ทดสอบชิมที่ผ่านการฝึกฝน จำนวน 20 คน ทดสอบคุณภาพด้านความใส กลิ่น รสชาติ และการยอมรับรวม (ไพโรจน์, 2539) ทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Student ' t Test

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved