บทที่ 3
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุ

3.1.1 วัตถุดิบ

1) ข้าวก่ำพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ดจากหน่วยวิจัยข้าวก่ำ (Purple Rice Research unit, PRRU) สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่

2) น้ำดื่ม จากบริษัท เชียงใหม่โพสตาร์ (1992) จำกัด จังหวัดเชียงใหม่

3.1.2 เอนไซม์ และจุลินทรีย์

1) เอนไซม์ทางการค้ามี 2 ชนิด คือ เอนไซม์แอลฟาแอมิเลส (Termamyl SC; Novozymes A/S, Denmark) และเอนไซม์กลูโคแอมิเลส (SAN Super 360 L; Novozymes A/S, Denmark)

2) ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ทางการค้า คือ Hamony.nsac (Chr. Hansan; Novozymes A/S, Denmark) และ Fermiblanc (Chr. Hansan; Novozymes A/S, Denmark)

3.2 อุปกรณ์ และเครื่องมือ

1) เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Ohaus; Model TS2KS, USA)

2) เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (AND; Model HR-200, Japan)

3) เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดความสามารถในการวัด 0-32°Brix (ATAGO; Model N-2E, Japan)

4) เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (Cyber; Model scan-510, Singapore)

5) เครื่องวัดสี (Minolta chroma meter; Model CR-300, Japan)

6) เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-Vis Spectrophotometer; Rotina 46R, Germany)

7) เครื่องวัดความหนืด (Brookfield-Programmable Viscometer; Model LVDV-II+, Germany)

8) เตาให้ความร้อน (Favorit; Model 65A-68A, Malaysia)

9) ตู้อบลมร้อน (Memmert, Germany)

10) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Memmert; Model WB14, Germany)

11) เทอร์โมมิเตอร์ (Thermometer)

12) โถดูดความชื้น (Desiccators)

13) กระป๋องอบความชื้น (Moisture can)

14) ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และ 45 องศาเซลเซียส (Stuart, model, USA)

15) ชุดวิเคราะห์ไขมัน (Soxtec aventi 2050, USA)

16) เครื่องย่อยตัวอย่างด้วยกรด (Digester; Tecator, Sweden)

17) เครื่องกลั่นไนโตรเจน (211 Kjeltec Distillation Unit; Foss Tecator, Sweden)

18) เครื่องวัดปริมาณแอลกอฮอล์ (Ebulliometer)

19) เตาเผาอุณหภูมิสูง (Muffle Furnace) (Gallenkamp: Model FSE520, England)

20) เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC; Hewlett Packard, USA)

21) อุปกรณ์อื่นๆ เช่น ช้อนตักสาร บีกเกอร์ ขวดความถ่วงจำเพาะ ขวดรูปชมพู่ กระบอกตวง ปิเปต บิวเรต กรวยแก้ว ขวดวัดปริมาตร หลอดทดลอง แท่งแก้วคน ถังพลาสติก กะละมัง หม้ออะลูมิเนียม เครื่องชั่งแบบสปริง ไม้พาย แอร์ล็อค เตาแก๊ส ชุดอุปกรณ์ทดสอบชิม เป็นต้น

3.3 สารเคมี

1) กรดซัลฟิวริก (Sulfuric aid; Merck, Germany)

2) กรดแอซีติก (Acetic acid; Merck, Germany)

3) กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid; Merck, Germany)

4) คอปเปอร์ซัลเฟท (Copper sulfate; Merck, Germany)

5) ซิงค์แอซีเทตไดไฮเดรท (Zinc acetate dihydrate; Ajax, Australia)

6) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide; Merck, Germany)

7) ปิโตรเลียมอีเทอร์ (Petroleum ether; LAB-SCAN, Ireland)

8) เมทานอล (Methanol HPLC grade; Fisher Science, UK)

9) เมธิลีนบลู (Methylene blue; Fisher Science, UK)

10) โซเดียมโพแตสเซียมทาร์เทรท (Sodium potassium tartrate; Ajax Finechem, Australia)

11) โพแตสเซียมเฟอโรไซยาไนด์ (Potassium ferrocyanide: AR grade; Fisher Science, UK)

12) ฟีนอล์ฟทาลีน (Phenolphthaline; Fisher Science, UK)

13) โปแตสเซียมเมตาไบซัลไฟท์ (Potassium metabisulfite; Union Science, Thailand)

14) ไดเอธิลอีเทอร์ (Diethyl ether; Merck, Germany)

15) สารแกมมา-โอรีซานอลมาตรฐาน (Gamma-oryzanol standard; Wakayama, Japan)

16) สารไซยานิดินไตรกลูโคไซด์มาตรฐาน (Cyanidin-3-glucoside standard; Shandong, China)

17) สารกรดแกมมา- อะมิโนบิวทิริคมาตรฐาน (Gamma-aminobutyric acid standard; Fluka, China)

3.4 วิธีการวิจัย

การศึกษากระบวนการผลิตน้ำหมักจากข้าวก่ำกล้องงอก แบ่งการวิจัยออกเป็น 5 ขั้นตอน ดังนี้

3.4.1 ศึกษาคุณภาพทางกายภาพ และเคมี ของข้าวก่ำพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ด

นำข้าวก่ำพันธุ์ก่ำดอยสะเก็ด ไปเข้าเครื่องกะเทาะเปลือกเพื่อให้ได้ข้าวก่ำกล้อง บรรจุในถุงพลาสติกซิปล๊อค และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการวิจัย สุ่มตัวอย่างตรวจวิเคราะห์สมบัติต่างๆ ดังนี้

คุณภาพทางกายภาพ

- อัตราการงอก ดัดแปลงวิธีวิเคราะห์ของ ISTA (1988)

คุณภาพทางเคมี

- ความชื้น วิเคราะห์โดยใช้ตู้อบลมร้อนแบบไฟฟ้า (AOAC, 2000)

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

- ไขมัน วิเคราะห์โดย Sohxlet extract method โดยการสกัดตัวทำละลายไดเอทิลอีเทอร์ (Diethyl ether extract method) (AOAC, 2000)

- เถ้า วิเคราะห์โดยวิธีการเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส (AOAC, 2000)

- คาร์โบไฮเดรต วิเคราะห์โดยวิธีการคำนวณโดยอาศัยผลต่างระหว่างร้อยละ 100 กับผลรวมของร้อยละความชื้น โปรตีน ไขมัน และเถ้า (AOAC, 2000)

- ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีของ Lane and Eynon (AOAC, 2000)

- กิจกรรมแอลฟาแอมิเลส วิเคราะห์โดยวิธี DNS (Miller, 1959)

- ปริมาณ GABA โดยใช้เครื่อง HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ดัดแปลงตามวิธีของ Timothy *et al.* (2010)

- ปริมาณแกมมา-โอรีซานอล โดยใช้เครื่อง HPLC ดัดแปลงตามวิธีของ Xu and Godber (1999)

- ปริมาณไซยานิดินไตรกลูโคไซด์ โดยใช้เครื่อง HPLC ดัดแปลงตามวิธีของ Ryu *et al.* (1998)

3.4.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการเพาะข้าวก่ำกล้อง

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการเพาะข้าวก่ำกล้อง ดัดแปลงจากวิธีของจารุรัตน์ และคณะ (2007) โดยนำข้าวก่ำกล้องจากขั้นตอนที่ 3.4.1 ไปแช่ในน้ำที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเพาะให้งอกในตู้ควบคุมอุณหภูมิแตกต่างกัน 3 ระดับ คือ อุณหภูมิห้อง (21-25 องศาเซลเซียส) 35 และ 45 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการเพาะแตกต่างกัน 8 ระดับ คือ 0 24 32 40 48 56 64 และ 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาในการเพาะ สุ่มตัวอย่างไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาแอมิเลส และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีในขั้นตอนที่ 3.4.1 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย เพื่อคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสม ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาแอมิเลส และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด

3.4.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยข้าวก่ำกล้องงอก

3.4.3.1 ศึกษาการย่อยข้าวก่ำกล้องงอกด้วยเอนไซม์ในข้าวงอก

การศึกษาการย่อยด้วยเอนไซม์ในข้าวงอก นำข้าวก่ำกล้องงอกที่ได้จากสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะจากขั้นตอนที่ 3.4.2 ไปบดผสมกับน้ำ โดยใช้ปริมาณข้าวก่ำกล้องงอกต่อน้ำในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 20:80 25:75 และ 30:70 นำไปให้ความร้อนจนเป็น 65 องศาเซลเซียส แล้วคงไว้ที่อุณหภูมินี้เพื่อให้เกิดการย่อยเป็นเวลา 3 ช่วงเวลา คือ 1 2 และ 3 ชั่วโมง ตามลำดับ หลังสิ้นสุดการย่อย สุ่มตัวอย่างไปกรองด้วยผ้าขาวบางแยกเอาเฉพาะส่วนของเหลวได้เป็นน้ำเชื่อมข้าวก่ำกล้องงอก นำไปตรวจวิเคราะห์คุณภาพต่างๆ ดังนี้

คุณภาพทางกายภาพ

- ค่าความหนืด นำผลิตภัณฑ์วัดค่าความหนืดด้วยเครื่องวัดความหนืด ยี่ห้อ Brook field model DV-III programmable rheometer

คุณภาพทางเคมี

- ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีของ Lane and Eynon (AOAC, 2000)
- ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด โดยใช้เครื่อง Hand refractometer (AOAC, 2000)
- ค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้เครื่อง pH meter (AOAC, 2000)
- ความถ่วงจำเพาะ โดยใช้ Pycnometer (AOAC, 2000)

วัดปริมาณของเหลวที่สกัดได้เพื่อนำไปคำนวณประสิทธิภาพในการเปลี่ยนข้าวก่ำกล้องงอกให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ วางแผนการทดลองแบบ 3 x 3 Factorial in CRD (Completely Randomized Design) โดยมีปัจจัยหลัก 2 ปัจจัย คือ อัตราส่วนของข้าวก่ำกล้องงอกและระยะเวลาในการย่อย วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) เลือกสภาวะที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการหมักในขั้นตอนต่อไป

3.4.3.2 ศึกษาการย่อยข้าวก่ำกล้องงอกด้วยเอนไซม์ในข้าวงอกร่วมกับเอนไซม์ทางการค้า

การศึกษาการย่อยข้าวก่ำกล้องงอกด้วยเอนไซม์ในข้าวงอกร่วมกับเอนไซม์ทางการค้า ดัดแปลงจากวิธีของชุลีพร (2548) โดยนำข้าวก่ำกล้องงอกจากสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะจากขั้นตอนที่ 3.4.2 บดผสมกับน้ำในอัตราส่วนที่เหมาะสมที่คัดเลือกจากขั้นตอนที่ 3.4.3.1 และนำไปต้มจนมีอุณหภูมิเป็น 65 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมเอนไซม์แอลฟาแอมิเลสทางการค้า (Termamyl SC) ในปริมาณร้อยละ 0.04 ของน้ำหนักข้าวก่ำกล้องงอก และเติมเอนไซม์กลูโคแอมิเลสทางการค้า (SAN Super 360 L) ในปริมาณร้อยละ 0.10 ของน้ำหนักข้าวก่ำกล้องงอก เก็บไว้ในภาชนะฉนวนกันความร้อน ปล่อยให้ย่อยเป็นเวลานานเท่ากับระยะเวลาที่เหมาะสมจากการทดลองขั้นตอนที่ 3.4.3.1 สุ่มตัวอย่างไปกรองด้วยผ้าขาวบางแยกเอาเฉพาะส่วนของเหลวได้เป็นน้ำเชื่อมข้าวก่ำกล้องงอก นำไปตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพและเคมีเช่นเดียวกับการทดลองในขั้นตอนที่ 3.4.3.1 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำน้ำเชื่อมส่วนที่เหลือศึกษาการหมักในขั้นตอนต่อไป

3.4.4 ศึกษาชนิดของน้ำหมักและยีสต์ที่เหมาะสมในการหมัก

การศึกษาชนิดของน้ำหมักและยีสต์ที่เหมาะสมในการหมัก ดัดแปลงจากวิธีของชุลีพร (2548) โดยนำน้ำเชื่อมข้าวก่ำกล้องงอกที่ได้จากการย่อยในสภาวะที่เหมาะสมจากขั้นตอนที่ 3.4.3.1 และน้ำเชื่อมข้าวก่ำกล้องงอก จากขั้นตอนที่ 3.4.3.2 เมื่ออุณหภูมิน้ำเชื่อมจากข้าวก่ำกล้องงอกลดลงเป็น 35 องศาเซลเซียส เติมเชื้อยีสต์ผงทางการค้า ได้แก่ Hamony.nsac และ Fermiblanc ในปริมาณ 0.2 กรัมต่อลิตร สามารถแบ่งสิ่งทดลองเป็น 4 แบบ คือ

- น้ำเชื่อมข้าวก่ำกล้องงอกที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ในข้าวงอกและเติมยีสต์ทางการค้า Harmony.nsac (ย่อยด้วยข้าวงอก + Harmony.nsac)
- น้ำเชื่อมข้าวก่ำกล้องงอกที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ในข้าวงอกและเติมยีสต์ทางการค้า Fermiblanc (ย่อยด้วยข้าวงอก + Fermiblanc)
- น้ำเชื่อมข้าวก่ำกล้องงอกที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ในข้าวงอกร่วมกับเอนไซม์ทางการค้าและเติมยีสต์ทางการค้า Harmony.nsac (ย่อยด้วยข้าวงอกและเอนไซม์ + Harmony.nsac)
- น้ำเชื่อมข้าวก่ำกล้องงอกที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ในข้าวงอกร่วมกับเอนไซม์ทางการค้าและเติมยีสต์ทางการค้า Fermiblanc (ย่อยด้วยข้าวงอกและเอนไซม์+ Fermiblanc)

นำสิ่งทดลองทั้ง 4 แบบ หมักในถังหมักที่ปิดฝาถังด้วย air lock ปล่อยให้เกิดการหมักที่อุณหภูมิห้อง สุ่มตัวอย่างน้ำหมักข้าวก่ำกล้องงอกตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพและเคมี ทุกๆ 1 วัน จนสิ้นสุดกระบวนการหมักเมื่อมีปริมาณแอลกอฮอล์คงที่ติดต่อกัน 3 วัน กรองด้วยผ้าขาวบางแยกเอาเฉพาะส่วนของเหลวได้เป็นน้ำหมักข้าวก่ำกล้องงอกไปตรวจวิเคราะห์คุณภาพ ดังนี้

คุณภาพทางกายภาพ

- ค่าสี นำไปวัดค่าของสีด้วยระบบ L, a*, b* ด้วยเครื่อง Minolta chroma meter

คุณภาพทางเคมี

- ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีของ Lane and Eynon (AOAC, 2000)
- ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด โดยใช้เครื่อง Hand refractometer (AOAC, 2000)
- ปริมาณแอลกอฮอล์ โดยใช้ Ebulliometer
- ค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้เครื่อง pH meter (AOAC, 2000)
- ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดแอซีติก โดยวิธีการไตรเตรท (Iland *et al.*, 1993)

จากผลการวิเคราะห์คุณภาพ คัดเลือกน้ำหมักที่เหมาะสมสำหรับเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์ 2 รูปแบบ โดยพิจารณาจากปริมาณแอลกอฮอล์ คือ น้ำหมักที่มีแอลกอฮอล์ต่ำนำไปเตรียมเป็นน้ำหมักข้าวก่ำกล้องงอกที่มีแอลกอฮอล์ต่ำ ส่วนน้ำหมักที่มีแอลกอฮอล์สูงนำไปเตรียมเป็นน้ำหมักข้าวก่ำกล้องงอกที่มีแอลกอฮอล์สูงในขั้นตอนต่อไป

3.4.5 ศึกษารูปแบบผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสมของน้ำหมักข้าวก่ำกล้องงอก

นำน้ำหมักข้าวก่ำกล้องงอกที่คัดเลือกในขั้นตอนที่ 3.4.4 ไปเตรียมเป็นน้ำหมักข้าวก่ำกล้องงอก 2 รูปแบบ คือ

3.4.5.1 น้ำหมักข้าวก่ำกล้องงอกที่มีแอลกอฮอล์ต่ำ

นำน้ำหมักที่มีแอลกอฮอล์ต่ำ ผ่านการกรองหยาบแล้วผสมกับน้ำข้าวก่ำกล้องงอกที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ในข้าวงอก จากขั้นตอนที่ 3.4.3.1 เพื่อปรับให้มีความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ให้เป็นร้อยละ 0.5 จากนั้นปรับความหวาน โดยการปรับให้มีความเข้มข้นของของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด 3 ระดับ คือร้อยละ 12 14 และ 16 นำไปบรรจุบรรจุลงขวดแก้วปริมาตร 500 มิลลิลิตร ปิดฝาจีบให้สนิท นำไปต้มฆ่าเชื้อในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที แล้วทำให้เย็นโดยการแช่น้ำ คัดเลือกสูตรที่เหมาะสมโดยการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยผู้ทดสอบชิมจำนวน 50 คน วางแผนการทดลองแบบ RCBD (Randomized Complete Block Design) วิเคราะห์ความแปรปรวนแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT (Duncan's New Multiple Rang Test)

3.4.5.2 น้ำหมักข้าวก่ำกล้องงอกที่มีแอลกอฮอล์สูง

นำน้ำหมักที่มีแอลกอฮอล์สูง เติมโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ (KMS) ในระดับ 275 มิลลิกรัมต่อลิตร ทิ้งให้ตกตะกอนที่อุณหภูมิห้อง ดูดเฉพาะส่วนใส บรรจุลงขวดแก้วปริมาตร 500 มิลลิลิตร ปิดฝาจีบให้สนิท

นำน้ำหมักทั้ง 2 รูปแบบ เปรียบเทียบคุณภาพทางกายภาพ และเคมี วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design: CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวน และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) โดยวิเคราะห์ดังนี้

คุณภาพทางกายภาพ

- ค่าสี นำไปวัดค่าของสีด้วยระบบ L, a*, b* ด้วยเครื่อง Minolta chroma meter

คุณภาพทางเคมี

- ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีของ Lane and Eynon (AOAC, 2000)
- ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด โดยใช้เครื่อง Hand refractometer (AOAC, 2000)
- ค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้เครื่อง pH meter (AOAC, 2000)
- ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดอะซิติก โดยวิธีการไตรเตรท (Iland *et al.*, 1993)
- ปริมาณแอลกอฮอล์ โดยใช้ Ebulliometer
- ปริมาณ GABA ดัดแปลงตามวิธีของ Timothy *et al.* (2010)
- ปริมาณแกมมา-โอรีซานอล ดัดแปลงตามวิธีของ Xu and Godber (1999)
- ปริมาณไซยานิดินไตรกลูโคไซด์ ดัดแปลงตามวิธีของ Ryu *et al* (1998)

นอกจากนี้ยังทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสเปรียบเทียบกันระหว่างน้ำหมักข้าวก่ำกล้องงอกที่มีแอลกอฮอล์ต่ำ และน้ำหมักข้าวก่ำกล้องงอกที่มีแอลกอฮอล์สูง เพื่อคัดเลือกผลิตภัณฑ์ที่ชอบ วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)