

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

3.1.1 วัสดุ อุปกรณ์

1.1 เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas chromatography, GC)

1) รุ่น GC-14B ของบริษัทชิมัดซึ (Shimadzu) ประเทศญี่ปุ่น ต่อกับตัวตรวจวัดชนิดเอฟไอดี (Flame ionization detector, FID) ของบริษัทชิมัดซึ ประเทศญี่ปุ่น

2) เครื่องประมวลผลรุ่น 7 Ae plus ของบริษัทชิมัดซึ ประเทศญี่ปุ่น

3) คอลัมน์ 20 เปอร์เซนต์ PEG-20M บริษัทชิมัดซึ ประเทศญี่ปุ่น ความยาว 3 เมตร ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.25 มิลลิเมตร ความหนาของแผ่นฟิล์มที่เคลือบ 0.25 ไมโครเมตร

1.2 สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) รุ่น UV-1601 บริษัทชิมัดซึ ประเทศญี่ปุ่น

1.3 เครื่องวัดความเป็นกรด ด่าง (pH meter) รุ่น pH/ATC electrode บริษัทซาโตเรียส (Satorius) ประเทศสหรัฐอเมริกา

1.4 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น BP221S บริษัทซาโตเรียส ประเทศสหรัฐอเมริกา

1.5 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น BP3100S บริษัทซาโตเรียส ประเทศสหรัฐอเมริกา

1.6 คิวเวต (Cuvette) แบบควอตซ์ (Quartz) บริษัทเฮลล์มา (Hellma) ประเทศออสเตรเลีย

1.7 เข็มฉีดยาสำหรับเครื่องแก๊ส โครมาโตกราฟี (Syringe for GC) ขนาด 5 ไมโครลิตร บริษัท SGE (เอสจีอี) ประเทศออสเตรเลีย

1.8 แฮนด์เรฟราคโตมิเตอร์ (Hand Refractometer)

1.9 Auto pipette ขนาด 200, 1000 และ 5000 ไมโครลิตร ของบริษัท Gilson ประเทศฝรั่งเศส

1.10 ข้าวเหนียวขาวสายพันธุ์ กข. 6 ชื่อจากตลาดบางลำพู อ. เมือง จ. ขอนแก่น

1.11 ข้าวเหนียวดำที่ ปลูกใน จ. ขอนแก่น ได้รับความอนุเคราะห์จากคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

1.12 ข้าวเหนียวดำที่ปลูกใน จ. นครราชสีมา จ. เชียงราย และ จ. ร้อยเอ็ด ชื่อจากตลาดบางลำพู อ. เมือง จ. ขอนแก่น

1.13 *M. purpureus* TISTR 3002, 3385, 3541, 3090 ชื่อจากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) และ *R. oryzae* ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.พัฒนา เหล่าไพบูลย์

1.14 แบคทีเรียก่อโรค 5 สายพันธุ์ *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* TISTR 029, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27533, *Escherichia coli* TISTR 073 และ *Enterobacter aerogenes* TISTR 1540 ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

1.15 ยีสต์ผง *Saccharomyces bayanus* EC1118 ชื่อมาจากบริษัท Lallemand ประเทศออสเตรเลีย

1.16 น้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ ของบริษัทมิตรผล

1.17 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (Auto clave) UM-65L-VA United Machanical

ประเทศไทย

1.18 เครื่องบ่มควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า

1.19 ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ

1.20 กระดาษกรอง Whatman no.1

1.21 เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator)

3.1.2 สารเคมี

ตารางที่ 3.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

ที่	ชื่อสาร	ความบริสุทธิ์ (เปอร์เซ็นต์)	ผลิตโดย	ประเทศ
1	Diammonium hydrogen phosphate	Food grade	Starrate Pty	ออสเตรเลีย
2	Magnesium sulfate	99.5	BDH	สหรัฐอเมริกา
3	Potassium metabisulfite	Food grade	-	-
4	Buffer pH 4	-	Ajax	ออสเตรเลีย
5	Buffer pH 7	-	Ajax	ออสเตรเลีย
6	Potassium chloride	99	Ajax	ออสเตรเลีย
7	Phenolphthalein	99	Sigma	สหรัฐอเมริกา
8	Sodium hydroxide	97	Ajax	ออสเตรเลีย
9	Sodium chloride	98	Ajax	ออสเตรเลีย
10	Ethanol	99.7	BDH	อังกฤษ
11	Propanol	99.5	BDH	อังกฤษ
12	Phenol	99	BDH	อังกฤษ
13	Sulfuric acid	99.8	Merck	สวิตเซอร์แลนด์
14	Glucose	99.5	Ajax	ออสเตรเลีย
15	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)	-	Sigma	สหรัฐอเมริกา
16	Gallic acid	99	BDH	อังกฤษ
17	Folin-Ciocalteu	-	BDH	อังกฤษ
18	Sodium carbonate	99.9	BDH	อังกฤษ
19	Gamma oryzanol	98	Wako	ญี่ปุ่น
20	Sodium sulfate	99	Sigma	สหรัฐอเมริกา
21	Potassium sodium tartrate	99	Sigma	สหรัฐอเมริกา
22	Starch	98	Merck	สวิตเซอร์แลนด์

ตารางที่ 3.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย (ต่อ)

ที่	ชื่อสาร	ความบริสุทธิ์	ผลิตโดย	ประเทศ
23	Glutinous rice starch powder	Food	ง่วนฮุน	ไทย
24	Hydrochloric acid	37	Merck	สวิตเซอร์แลนด์
25	Potassium iodide	99	Ajax	ออสเตรเลีย
26	Sodium thiosulphate	99	Ajax	ออสเตรเลีย
27	Methanol	100	Merck	สวิตเซอร์แลนด์
28	Iodine	99.9	Ajax	ออสเตรเลีย
29	Copper sulfate	99	Ajax	ออสเตรเลีย
30	Ammonium molybdate	99	Ajax	ออสเตรเลีย
31	Sodium hydrogen arsenate	99	Sigma	สหรัฐอเมริกา
32	Sodium bicarbonate	98	Ajax	ออสเตรเลีย
33	Dimethyl sulfoxide	99.9	Sigma	สหรัฐอเมริกา
34	Barium chloride	99	Ajax	ออสเตรเลีย
35	Sodium hydrogen carbonate	99	Univar	ออสเตรเลีย
36	Potato dextrose agar	Microbiology	Himedia	อินเดีย
37	Beef extract	Microbiology	Himedia	อินเดีย
38	Peptone	Microbiology	Himedia	อินเดีย
39	Agar	Bacteriological	Himedia	อินเดีย

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 การทดสอบหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการแช่ข้าว

นำข้าวเหนียวขาวพันธุ์ กข.6 และข้าวเหนียวดำจากแหล่งต่างๆ 3 แหล่ง ได้แก่ ข้าวเหนียวดำจาก จ. เพชรบูรณ์ จ. นครราชสีมา และ จ. เชียงราย อย่างละ 500 กรัม แช่น้ำในน้ำกรอง 1.5 ลิตร แล้วทำการเก็บตัวอย่างที่ เวลา 0 3 6 9 12 15 18 21 และ 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักที่ผิวเมล็ดจนแห้ง ชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง แล้วนำไปอบแห้ง ที่อุณหภูมิ 110 °C จนกระทั่ง ข้าวเหนียวมี น้ำหนักคงที่ จากนั้นทำให้ เย็นลง โดยนำไปวางใน โถสุญญากาศ เมื่อเย็นแล้วนำไปชั่งน้ำหนักอีกครั้งหนึ่ง เพื่อ คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นในเมล็ดข้าว และ ทดสอบหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการแช่ข้าว

โดยระยะเวลาที่เหมาะสมในการแช่ข้าวคือ เวลาที่ เมล็ดข้าวมีความชื้นคงที่ คือแม้จะแช่ข้าวต่อไป เปอร์เซ็นต์ความชื้นในเมล็ดข้าวก็ไม่เพิ่มขึ้น เป็นเวลาที่ข้าวเหนียวดูดซับน้ำเอาไว้อย่างเต็มที่แล้ว (จุดอิ่มตัว) แม้จะ แช่ข้าวเหนียวต่อไป ข้าวเหนียวก็ไม่สามารถดูดซับน้ำได้อีกแล้ว

3.2.2 การศึกษาการแดง *M. purpureus* ที่เหมาะสมในการผลิตสีโทแดง

ในการทดลองจะใช้ข้าวเหนียวขาวพันธุ์ กข.6 และข้าวเหนียวดำจาก จ.เพชรบูรณ์ เป็นวัตถุดิบในการ ผลิตสีโทแดงโดยใช้สายพันธุ์ *R. oryzae* 1 สายพันธุ์ รา *M. purpureus* 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *M. purpureus* TISTR

3002, 3385, 3541 และ 3090 ร่วมกับ ยีสต์ 1 สายพันธุ์คือ *S. bayanus* EC1118 ในกระบวนการผลิต สภาวะของการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3.2 นำสาโทแดงที่ผลิตได้มาวิเคราะห์หา ปริมาณสารสำคัญ เช่น ปริมาณสารสี ปริมาณแกมมาโอไรซานอล (Gamma-Oryzanol) ปริมาณสารแอนติออกซิแดนท์ (Antioxidant) ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds) เป็นต้น ขั้นตอนการผลิตสาโทแดงมีรายละเอียดดังนี้

ตารางที่ 3.2 สภาวะการทดลองผลิตสาโทแดง จากข้าวเหนียวขาวและข้าวเหนียวดำ โดยแปรผันราแดง 4 สายพันธุ์

ชุดทดลอง	วัตถุดิบ	รา	ยีสต์
1	ข้าวเหนียวขาว พันธุ์ กข. 6	<i>M. purpureus</i> TISTR 3002	<i>S. bayanus</i> EC1118
2		<i>M. purpureus</i> TISTR 3385	
3		<i>M. purpureus</i> TISTR 3541	
4		<i>M. purpureus</i> TISTR 3090	
5		<i>R. oryzae</i>	
6	ข้าวเหนียวดำ จาก จ.เพชรบูรณ์	<i>M. purpureus</i> TISTR 3002	
7		<i>M. purpureus</i> TISTR 3385	
8		<i>M. purpureus</i> TISTR 3541	
9		<i>M. purpureus</i> TISTR 3090	
10		<i>R. oryzae</i>	

3.2.2.1 กระบวนการเตรียมข้าวเหนียว ก่อนกระบวนการหมัก นำข้าวเหนียวไปล้างด้วยน้ำสะอาด เพื่อกำจัดกากและสิ่งสกปรกที่ติดมากับข้าว จากนั้นแช่ข้าวเหนียวในน้ำให้เมล็ดข้าวนุ่มและอมน้ำ จากนั้น นำข้าวเหนียวไปนึ่งให้สุกโดยใช้ อุณหภูมิประมาณ 100-110 °C เป็นเวลาประมาณ 20-40 นาที (ขึ้นอยู่กับชนิดของข้าว) นำข้าวเหนียวที่ นึ่งสุกแล้ว ไปล้างด้วยน้ำสะอาดเพื่อ ล้างเอาขางข้าวออก ให้หมด จนเมล็ด ข้าวไม่เหนียวติดกัน จากนั้นผึ่งให้ข้าวสะเด็ดน้ำประมาณ 5 นาที พรمد้วยสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ก่อนนำไปใช้ในกระบวนการหมักสาโท

3.2.2.2 กระบวนการหมักสาโท แบ่งออกเป็นสองขั้นตอนหลัก ได้แก่

1) การย่อยแป้งที่เป็นองค์ประกอบในเมล็ดข้าวให้ได้ เป็นน้ำตาลโดยเชื้อรา โดยการซังข้าวเหนียวขาวหรือข้าวเหนียวดำที่เตรียมไว้แล้วจากข้อ 3.2.2.1 จำนวน 1 กิโลกรัม บรรจุลงในขวดโหลแก้วขนาด ปริมาตร 6 ลิตร ที่ได้ลวกน้ำร้อนเพื่อฆ่าเชื้อแล้ว ใช้กล้าเชื้อราบริสุทธิ์ที่มีสปอร์จำนวน 2.5×10^8 สปอร์ต่อข้าวเหนียวหนึ่งสุก 1 กิโลกรัม คลุกผสมรากับข้าวเหนียวให้ทั่ว คลุมปากขวดโหลด้วยผ้าขาวบาง 2 ชั้นแล้วปิดด้วยฝาอย่างหลวมๆ ตั้งบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5 วันสำหรับข้าวเหนียวขาว และ 14 วันสำหรับข้าวเหนียวดำ ซึ่งระหว่างกระบวนการย่อยแป้งจะ สังเกตเห็นการเจริญของราบนเมล็ดข้าวเหนียวและเห็นน้ำเฝิ้มออกมาซึ่งเรียกว่า “น้ำค้อย” ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนที่ เชื้อราทำการย่อยแป้งแล้วได้เป็นน้ำตาลเกิดขึ้น เก็บตัวอย่าง น้ำค้อยโดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ หาปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยแป้งของเชื้อราเมื่อเลี้ยงบนข้าวเหนียวสายพันธุ์ต่างๆ

2) การหมักเพื่อเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์โดยเชื้อยีสต์ หลังจากกระบวนการย่อยแป้งสิ้นสุดลง ทำการผ่านน้ำโดยการเติมน้ำเชื่อมที่ต้มฆ่าเชื้อแล้วเป็นจำนวน 4 เท่าของน้ำหนักรำข้าวเหนียว โดยรับปริมาณน้ำตาล (ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายประมาณ 18-20 °Brix และเติมไดแอมโมเนียม ไฮโดรเจน ฟอสเฟต (Diammonium hydrogen phosphate, DAP) และแมกนีเซียมซัลเฟต (Magnesium sulfate, $MgSO_4$) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 g/L และ 0.1 g/L ตามลำดับ จากนั้นตรวจสอบปริมาณของแข็งที่ละลายได้โดยใช้ Hand Refractometer เพื่อตรวจสอบปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด (°Brix) เริ่มต้น ก่อนเติมยีสต์เพื่อเริ่มต้นการหมัก โดยเติมเชื้อยีสต์ทางการค้าสายพันธุ์ *S. bayanus* EC1118 แห่งที่ผ่านการทำไรโซเครชัน เป็นเวลา 30 นาทีในปริมาณ 0.35 g/L ลงไปในขวดโหล บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 20 วันเพื่อให้ยีสต์เปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ ติดตามกระบวนการหมักโดยการเก็บตัวอย่างน้ำ หมักทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 20 วัน โดยติดตามการเปลี่ยนแปลงทางเคมีระห ว่างกระบวนการหมัก ดังต่อไปนี้ (วิธีการวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก)

- (1) การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดโดยใช้ Hand Refractometer
- (2) การวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้ pH meter
- (3) การวิเคราะห์ปริมาณกรดรวม โดยวิธีการไตเตรต
- (4) การตรวจนับจำนวนเซลล์ยีสต์โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์
- (5) การวิเคราะห์ความเข้มข้นของเอทานอล โดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี
- (6) การวัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธี Phenol-sulfuric
- (7) การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Somogyi-Nelson

3) กระบวนการหลังการหมัก เมื่อกระบวนการหมักสาโทสิ้นสุดลง จะทำการแรกกิ้ง (Racking) 2 ครั้ง โดยครั้งแรกจะแรกกิ้งสาโทบรรจุในขวดโหลใหม่ที่สะอาด โดยเติมโปแตสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ (Potassium metabisulfite, KMS) ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 20 มิลลิกรัมต่อลิตรเพื่อฆ่าเชื้อและ หยุดการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นทำการแรกกิ้งครั้งที่ 2 โดยถ่ายสาโทลงในขวดแก้วสีชา แล้วเติมโปแตสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 20 mg/L เพื่อช่วยป้องกันการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและปฏิกิริยาออกซิเดชัน ที่จะทำให้ผลิตภัณฑ์เปลี่ยนสี บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำไป ตรวจสอบคุณสมบัติทางเคมีดังนี้ (วิธีการวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก)

- (1) การวิเคราะห์หาปริมาณสารแอนติออกซิแดนท์ในสาโทโดยวิธี DPPH
- (2) การวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกโดยวิธี Folin-Ciocalteu
- (3) การหาปริมาณสารแกมมาโอไรซานอลโดยวิธี UVspectrophotometric method
- (4) การหาปริมาณสารสีที่เกิดขึ้นโดยวิธี UV spectrophotometric method
- (5) Color intensity โดยวิธี UV spectrophotometric method
- (6) การหาปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ทั้งหมดโดยวิธี Ripper
- (7) การหาปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์อิสระ โดยวิธี Ripper

วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ ด้วยวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบมีปัจจัยเดียว (Univariate) และใช้ Duncan's Multiple Range Test ประเมินตัวอย่างระหว่างตัวอย่าง ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.05$) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป V. 20 software for windows (SPSS)

3.2.3 การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยแป้งของรา 5 สายพันธุ์

ทำการทดสอบประสิทธิภาพการย่อยแป้งของรา 5 สายพันธุ์ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Glutinous rice starch agar ตามวิธีของ Dung et al. (2006) มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. เลี้ยงรา *R. oryzae* 1 สายพันธุ์ และ *M. purpureus* 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *M. purpureus* TISTR 3002 3385 3541 และ 3090 บนอาหาร potato dextrose agar (PDA)
2. ใช้ Cork borer ขนาด 0.5 เซนติเมตรเจาะรู บนจานอาหาร PDA จากข้อ 1. แล้วใช้เข็มเย็บเชื้อ เชื้อขึ้นอาหาร PDA ที่มีเส้นใยราไปวางบนจานอาหาร Glutinous rice starch agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 2 วันสำหรับ *R. oryzae* และ 7 วันสำหรับ *M. purpureus* ทั้ง 4 สายพันธุ์
3. ใช้ 0.25 เปอร์เซ็นต์ สารละลายไอโอดีนเททับบนจานอาหาร Glutinous rice starch agar เป็นเวลา 10 นาที
4. วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณ โชนใสที่เกิดจากการย่อยแป้งของรา

3.2.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบในข้าวเหนียว เพื่อคัดเลือกชนิดที่เหมาะสมในการผลิตสาโทแดง

ทำการทดสอบหาองค์ประกอบที่สำคัญ ในข้าวเหนียวขาว พันธุ์ กข. 6 และข้าวเหนียวดำที่มาจากแหล่งต่างๆ ได้แก่ข้าวเหนียวดำจากคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ข้าวเหนียวดำจาก จ. นครราชสีมา จ. เชียงราย และ จ. ร้อยเอ็ด โดยวิเคราะห์หาปริมาณสารแกมมา โอไรซานอล สารแอนโธไซยานิน สารประกอบฟีนอลิก และสารแอนติออกซิแดนซ์

3.2.4.1 การสกัดสารแกมมาโอไรซานอลในข้าว

1. สกัดสารแกมมาโอไรซานอล ใน ตัวอย่างข้าว 1 กรัม โดยใช้เอทานอล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มไว้ในเครื่องบ่ม แบบเขย่า ที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 60 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้ความเร็วรอบของการเขย่า 200 rpm
2. กรองตัวอย่างผ่านกระดาษกรอง Whatman no.1
3. นำสารละลาย ที่ผ่านการกรอง แล้วไปวิเคราะห์หาปริมาณสารแกมมา โอไรซานอล เช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.2.2 (ภาคผนวก)

3.2.4.2 การสกัดสารแอนโธไซยานิน สารแอนติออกซิแดนซ์ และสารประกอบฟีนอลิกในข้าว

1. สกัดสารแอนโธไซยานิน ในตัวอย่างข้าว 10 กรัม โดยใช้สารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์ HCl ใน Methanol ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มไว้ในเครื่องบ่ม แบบเขย่า ที่ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้ความเร็วรอบในการเขย่า 200 rpm
2. กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman no.1
3. นำสารละลายไประเหยโดยใช้เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary Evaporator) ที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 15 นาที

4. ละลายสารสกัดโดยใช้น้ำกลั่นปราศจากไอออนสำหรับวิเคราะห์ สารแอนติออกซิแดนท์ และสารประกอบฟีนอลิกในข้าวเช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.2.2 (ภาคผนวก) และวิเคราะห์ปริมาณสารแอนโทไซยานิน (ภาคผนวก)

3.2.5 การผลิตสาโทแดงโดยใช้ข้าวเหนียวดำและราแดงสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้

จากการทดลองที่ 3.2.3 และ 3.2.4 สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ข้าวเหนียวดำที่มีองค์ประกอบ สารสำคัญ อยู่สูงที่สุดสองอันดับแรกได้แก่ ข้าวเหนียวดำจากคณะเกษตรศาสตร์ มข. และข้าวเหนียวดำจาก จ. ร้อยเอ็ด (โดยมี ข้าวเหนียวขาวพันธุ์ กข.6 เป็นชุดการทดลองควบคุม) และได้คัดเลือกสายพันธุ์ราที่มีประสิทธิภาพในการย่อยแป้ง ได้ดีที่สุดคือ *M. purpureus* TISTR 3002 (โดยใช้ *R. oryzae* เป็นชุดการทดลองควบคุม) นำมาใช้ในกระบวนการผลิตสาโทแดง ดังแสดงในตารางที่ 3.3

โดยกระบวนการเตรียมข้าวเหนียว กระบวนการหมัก รวมไปถึงการตรวจติดตามหลังกระบวนการหมัก ทำเช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.2.2

ตารางที่ 3.3 แสดงชุดทดลองเพื่อเลือกสายพันธุ์ข้าวเหนียวดำและราที่เหมาะสมในการผลิตสาโทแดง

ชุดทดลอง	วัตถุดิบ	รา	ยีสต์
1	ข้าวเหนียวขาวพันธุ์ กข. 6	<i>M. purpureus</i> TISTR 3002	<i>S. bayanas</i> EC 1118
2		<i>R. oryzae</i>	
3	ข้าวเหนียวดำ จากคณะเกษตรศาสตร์ มข.	<i>M. purpureus</i> TISTR 3002	
4		<i>R. oryzae</i>	
5	ข้าวเหนียวดำ จาก จ. ร้อยเอ็ด	<i>M. purpureus</i> TISTR 3002	
6		<i>R. oryzae</i>	

3.2.6 การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างข้าวเหนียวดำต่อข้าวเหนียวขาวในการผลิตสาโทแดง

การทดลองนี้ได้แปรผันอัตราส่วนระหว่างข้าวเหนียวดำจาก จ. ร้อยเอ็ดต่อข้าวเหนียวขาวพันธุ์ กข.6 ในอัตราส่วน 0:100 55:45 70:30 85:15 และ 100:0 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในกระบวนการผลิตสาโทแดง ร่วมกับการใช้ราที่มีประสิทธิภาพในการย่อยแป้ง ดังตารางที่ 3.4

โดยกระบวนการเตรียมข้าวเหนียว กระบวนการหมัก รวมไปถึงการ วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสาโทแดงที่ผลิตได้หลังกระบวนการหมัก ดำเนินการแบบเดียวกับการทดลองที่ 3.2.2 และการทดลองที่ 3.2.5 และการทดลองนี้เพิ่มเติมการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค ของสาโทแดงที่ผลิตได้

ตารางที่ 3.4 แสดงชุดทดลอง ของการทดลองการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างข้าวเหนียวดำจาก จ. ร้อยเอ็ดต่อ ข้าวเหนียวขาวพันธุ์ กข. 6 ในการผลิตสาโทแดง

ชุดทดลอง	วัตถุดิบ (เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก)		รา	ยีสต์
	ข้าวเหนียวดำ จ. ร้อยเอ็ด	ข้าวเหนียวขาว พันธุ์ กข. 6		
1	0	100	<i>M. purpureus</i> TISTR 3002	<i>S. bayanus</i> EC 1118
2			<i>R. oryzae</i>	
3	55	45	<i>M. purpureus</i> TISTR 3002	
4			<i>R. oryzae</i>	
5	70	30	<i>M. purpureus</i> TISTR 3002	
6			<i>R. oryzae</i>	
7	85	15	<i>M. purpureus</i> TISTR 3002	
8			<i>R. oryzae</i>	
9	100	0	<i>M. purpureus</i> TISTR 3002	
10			<i>R. oryzae</i>	

3.2.7 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคของสาโทแดง

นำสาโทแดงที่ผลิตได้จากการทดลองที่ 3.2.6 มาทำการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* TISTR 029, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27533, *Escherichia coli* TISTR 073 และ *Enterobacter aerogenes* TISTR 1540 โดยใช้วิธี agar diffusion assay

เนื่องจากสาโทแดงที่ผลิตได้ มีความเข้มข้นของสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในปริมาณต่ำ เพื่อให้การทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคของสาโทแดงสัมฤทธิ์ผล จึงต้องทำให้สาโทแดงมีความเข้มข้นขึ้น โดยนำเอาสาโทแดงที่ผลิตได้ไปทำการระเหยโดยใช้เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary Evaporator) ตามขั้นตอน ดังต่อไปนี้

1. นำตัวอย่างสาโทแดง ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ไปผ่านกระบวนการระเหยโดยใช้เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary Evaporator) ที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 45 นาที
2. ละลายสาโทแดงโดยใช้ 20 เปอร์เซ็นต์ Dimethyl sulfoxide (DMSO) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร
3. กรองตัวอย่าง ผ่าน กระดาษกรอง (Membrane filter) ปลอดเชื้อขนาด 0.2 ไมครอน สำหรับทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค 5 สายพันธุ์
4. Streak เชื้อแบคทีเรียก่อโรค 5 สายพันธุ์ลงบนอาหาร Nutrient Agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
5. นำโคโลนีเดี่ยว มา 2-3 โคโลนี ใส่ใน 0.85 เปอร์เซ็นต์ NaCl (w/v) ปลอดเชื้อ และปรับความขุ่นของเชื้อให้ได้เท่ากับ 0.5 McFarland Standard

6. ใช้ Cotton swab ปกป้องเชื้อ จุ่มสารละลายแบคทีเรียที่เตรียมไว้ นำมาป้าย (swab) ให้ทั่วอาหาร NA แล้วใช้ Cork borer ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะบนอาหาร NA
7. หยดตัวอย่างสาโทแดงเข้มข้น ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่จะเจาะบนอาหาร NA โดยใช้ยาปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอล (Chloram phenicol) ความเข้มข้น 500 mg/l เป็น positive control และใช้ 20 เปอร์เซ็นต์ DMSO เป็น negative control จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
8. วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (Inhibition zone) ที่เกิดขึ้น

3.2.8 การทดสอบทางประสาทสัมผัส

หลังจากวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ของตัวอย่างสาโทแดงแล้ว คัดเลือกสาโทแดงที่มี ปริมาณสารสำคัญสูงที่สุด 4 อันดับแรก (สารแกมมาโอไรซานอล สารแอนติออกซิแดนท์ สารประกอบฟีนอลิก colour intensity และสารสี รวมไปถึงตัวอย่างสาโทแดงที่มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค) โดยใช้สาโทแดงที่ผลิตจากข้าวเหนียวขาวร่วมกับการใช้ราสายพันธุ์ *M. purpureus* TISTR 3002 เป็นตัวอย่างควบคุมร่วมกับตัวอย่างสาโทที่มีจำหน่ายในท้องตลาด รวมจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 6 ตัวอย่าง

โดยมีผู้เข้าร่วมทดสอบทางประสาทสัมผัสจำนวน 30 คน ที่ไม่ปฏิบัติภารกิจดื่มแอลกอฮอล์ ผู้ทดสอบชิมจะประเมินตัวอย่างสาโทตามแบบประเมินในภาพที่ 3.1

ID.....

(ตัวอย่าง แบบประเมินคุณภาพด้านประสาทสัมผัส)

ชื่อ – นามสกุล ผู้ทดสอบ.....

สถานที่ทำการทดสอบ.....

วัน/เดือน/ปี.....เวลา.....

ตัวอย่างสาโท(หมายเลข)						
องค์ประกอบ						
สี (ระดับคะแนน 0-2)						
ความใส (ระดับคะแนน 0-2)						
กลิ่น (ระดับคะแนน 0-4)						
รสชาติ (ระดับคะแนน 0-12)						
รวม (20 คะแนน)						

*****โปรดระบุความคิดเห็นของท่านต่อตัวอย่างตามลักษณะต่อไปนี้โดยให้คะแนนตามความรู้สึกของท่านมากที่สุด

หลักเกณฑ์ในการให้คะแนน

1.สี

สาโทขาว	สาโทโรเซ่	คะแนน
สีขาวซีด	สีจืด/อ่อนมาก	0
สีคล้ำเข้มจัด	สีแดง	0
สีเหลืองอ่อน	สีแดงอ่อน	1
สีตามวัตถุดิบ	สีตามวัตถุดิบ	2

2. ความใส

ไม่ใส (ขุ่น)	0
ใส(แต่ไม่ใสจริง)	1
ใสเป็นประกายมองเห็นทะลุแก้วได้	2

3.กลิ่น

กลิ่นผิดปกติ/ไม่พึงประสงค์	0
กลิ่นอ่อนไม่สร้างความประทับใจใดๆ	1
กลิ่นที่เป็นแบบฉบับ	2
กลิ่นหอมละไม	3
กลิ่นหอมชวนดม/ประทับใจมาก	4

4. รสชาติ

ผิดปกติ (ความเปรี้ยว ฝาด ขม หวาน เกินควร)	0
ไม่มีความเป็นตัวของตัวเอง	1-3
อ่อน ปานกลาง แต่เป็นฉบับตามวัตถุดิบ	4-6
ได้สมดุลมีสุนทรีภาพ	7-9
เข้มข้นและประทับใจอย่างยิ่ง	10-12

ภาพที่ 3.1 แสดงตัวอย่างแบบประเมินที่ใช้ในการประเมินคุณภาพสาโททางด้านประสาทสัมผัส