# บทที่ 3
# วิธีดำเนินการวิจัย

## 3.1 วัตถุดิบและจุลินทรีย์

3.1.1 ข้าวท่อน รำข้าว และปลายข้าวพันธุ์ ขาวดอกมะลิ 105 จากบริษัทโรงสีข้าวสวนดุสิต จำกัด

3.1.2 *Amylomyce* spp. CM 105 จากสถาบันวิจัยไวน์และสุราพื้นบ้าน ภาควิชาวิศวกรรมอาหาร คณะวิศวกรรมและเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

## 3.2 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2.1 น้ำกลั่น

3.2.2 น้ำกรอง

3.2.3 สารละลายด่าง NaOH ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

3.2.4 สาร 3, 5 - dinitrosalicylic acid (DNS)

3.2.5 สารโพแทสเซียมโซเดียม ทาร์เตรท (Potassium sodium tartrate)

3.2.6 สารโพแทสเซียมไฮโดรเจนพาเลต (Porassium hydrogenphathalate)

3.2.7 สารฟีนอล์ฟทาลีน (Phenolpthalein)

3.2.8 อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar ของบริษัท Merck

3.2.9 อาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar ของบริษัท Merck

## 3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ

3.3.1 ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.3.2 เข็มเขี่ยเชื้อ และ ลวดเขี่ยเชื้อ

3.3.3 เทอร์โมมิเตอร์

3.3.4 บีกเกอร์

3.3.5 เครื่องแก้วและฟลาสก์ขนาดต่าง ๆ

3.3.6 กระบอกตวงขนาดต่าง ๆ

3.3.7 ปิเปตขนาด 1 5 และ 10 มิลลิลิตร

3.3.8 บิวเรตต์ขนาด 10 มิลลิลิตร

3.3.9 หลอดทดสอบ

3.3.10 แก๊สหุงต้มพร้อมเตา

3.3.11 โหลหมักขนาดปากกว้าง 10 เซนติเมตร

3.3.12 ผ้าขาวบาง

3.3.13 ตู้เย็น

3.3.14 กล้องจุลทรรศน์ (รุ่น MBL 2000, A:KRUSS, German)

3.3.15 อุปกรณ์เครื่องครัวที่ใช้ในการต้มต่างๆ เช่น ทัพพี หม้อ เป็นต้น

3.3.16 อ่างน้ำร้อน (Water bath)

3.3.17 ตู้ปลอดเชื้อ (Larminar flow)

3.3.18 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)

3.3.19 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) บริษัท Memmert

3.3.20 หม้อนึ่งความดัน (Autoclave) บริษัท Hirayama

3.3.21 เตาอบไมโครเวฟ (รุ่น Model R - 241, SHARP, Japan)

3.3.22 เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) รุ่น UV - 1601 ผลิตโดย บริษัท Shimudzu ประเทศญี่ปุ่น

3.3.23 เครื่องสั่นหลอดทดลอง (Vortex mixer) ของ Scienctific Industries

3.3.24 Hand refractometer รุ่น N-1 ผลิตโดยบริษัท ATAGO ประเทศญี่ปุ่น

3.3.25 เครื่องวัด pH รุ่น HM 7E ของ TOA Electronics

3.3.26 เครื่องชั่งชนิดหยาบ และ ชนิดละเอียด 4 ตำแหน่ง รุ่น A-200s ของ Satorious

3.3.27 เครื่องชั่งแบบดิจิตอล รุ่น Precisa

3.3.28 เครื่องวัดค่าสี (Handy Colorimeter) Nippon Denshoku รุ่น NR 3000 A

3.3.29 เครื่องวัดความหนืด (Viscometer) Brookfield RVD –II+

3.3.30 เครื่องวัดค่าค่าพีเอช (pH meter) Consorp รุ่น C832

## 3.4 ระเบียบวิธีวิจัย

### 3.4.1 การเตรียมกล้าเชื้อรา

1) การเก็บรักษาเชื้อรา

เลี้ยงเชื้อราบนอาหารแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA) ที่มีผิวหน้าของอาหารเอียงโดยเก็บรักษาไว้ในตู้เย็น ก่อนการใช้งานจะมีการถ่ายเชื้อราลงสู่อาหารใหม่แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน แล้วจึงนำเชื้อราไปใช้งานได้ ส่วนเชื้อราที่ใช้สำหรับเป็น stock culture จะมีการถ่ายเชื้อสู่อาหารใหม่ทุก ๆ 1 เดือน

2) การเตรียมโคจิข้าว

นำเชื้อรา *Amylomyces* มาเตรียมเป็นกล้าเชื้อราแบบโคจิข้าวของญี่ปุ่น โดยเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA เป็นเวลา 5-7 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นล้างสปอร์โดยใช้น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อเชื้อรา 1 หลอด นำสปอร์แขวนลอยของเชื้อราเติมลงในข้าวนึ่งที่ฆ่าเชื้อแล้ว (น้ำหนัก 300 กรัม บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ที่ปิดด้วยจุกสำลี) โดยใช้อัตราส่วนของสปอร์แขวนลอย 10 % (สปอร์แขวนลอย 10 มิลลิลิตรต่อข้าวเหนียวนึ่ง 100 กรัม) คลุกเคล้าให้เข้ากันและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 5-7 วัน

### 3.4.2 การเตรียมข้าวนึ่ง

นำข้าวอัตราส่วนต่าง ๆ กันมาแช่น้ำประมาณ 3 ชั่วโมง นำไปนึ่งด้วยไอน้ำ 20 นาที (อาจมากหรือน้อยกว่านี้ขึ้นอยู่กับปริมาณของข้าวที่ใช้ แต่ต้องนึ่งให้ข้าวสุก) จากนั้นนำข้าวนึ่งมาผึ่งให้เย็น ชั่งข้าวนึ่งตามอัตราส่วนที่ต้องการใช้ในการทดลองใส่ในถุงพลาสติก นำเข้า autoclave ใช้ความร้อนอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำใส่ภาชนะหมักซึ่งเป็นโหลแก้วปากกว้างที่ฆ่าเชื้อโดยการลวกด้วยน้ำร้อนสำหรับใช้ทดลองต่อไป

### 3.4.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไซรัปจากข้าวโดยใช้เชื้อรา *Amylomyces*

1) ศึกษาอัตราส่วนของข้าวหอมมะลิและปลายข้าวที่เหมาะสม

การทดลองขั้นนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอัตราส่วนของข้าวที่เหมาะสมในการผลิตไซรัป โดยผันแปรอัตราส่วนของข้าวดังนี้

(1) ข้าวท่อนหอมมะลิอย่างเดียว

(2) ข้าวท่อนหอมมะลิ 80 % + ปลายข้าวหอมมะลิ 20 %

(3) ข้าวท่อนหอมมะลิ 60 % + ปลายข้าวหอมมะลิ 40 %

(4) ข้าวท่อนหอมมะลิ 40 % + ปลายข้าวหอมมะลิ 60 %

นำโคจิข้าวที่เตรียมได้เติมลงในข้าวนึ่ง (ความชื้นเริ่มต้น 65 %) โดยใช้ปริมาณ โคจิข้าว 5 % (โดยน้ำหนักข้าวนึ่ง) จากนั้นคลุกเคล้าให้เข้ากันและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ในระหว่างการหมักสุ่มตัวอย่างสารละลายน้ำตาลทุกวันมาวิเคราะห์ดังนี้

- ปริมาณของแข็งทั้งหมดโดยใช้ Hand refractometer
- ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี DNS method
- ปริมาณกรดแลคติก โดยการไตเตรท
- พีเอช โดยใช้เครื่อง pH meter

เลือกสภาวะที่เหมาะสมที่สุดเพื่อนำไปศึกษาในขั้นต่อไป

2) ศึกษาปริมาณโคจิข้าวที่เหมาะสม

เมื่อคัดเลือกอัตราส่วนของข้าวที่เหมาะสมได้แล้ว นำผลการทดลองดังกล่าวมาศึกษาปริมาณโคจิข้าวที่เหมาะสม โดยผันแปรระดับโคจิข้าวที่ใช้ 10 15 และ 20 % (น้ำหนักโคจิข้าวต่อข้าวนึ่ง) ควบคุมสภาวะการหมัก การสุ่มตัวอย่างมาวิเคราะห์ และวางแผนการทดลอง เช่นเดียวกับการศึกษาในขั้นต้น เลือกสภาวะที่เหมาะสมที่สุดเพื่อนำไปศึกษาในขั้นต่อไป

3) ศึกษาปริมาณรำข้าวที่เหมาะสม

ทำการทดลองเช่นเดียวกับการศึกษาในขั้นต้น แต่ผันแปรการเติมรำข้าว 4 ระดับ คือ 1) ไม่เติมรำข้าว 2) เติมรำข้าว 1 % 3) เติมรำข้าว 2 % และ 4) เติมรำข้าว 3 % ควบคุมสภาวะการหมัก การสุ่มตัวอย่างมาวิเคราะห์ และวางแผนการทดลอง เช่นเดียวกับการศึกษาในขั้นต้น เลือกสภาวะที่เหมาะสมที่สุดเพื่อนำไปศึกษาในขั้นต่อไป

4) ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม

ทำการทดลองเช่นเดียวกับการศึกษาในขั้นต้น แต่ผันแปรอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม 4 ระดับ คือ 25 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส ควบคุมสภาวะการหมัก การสุ่มตัวอย่างมาวิเคราะห์ และวางแผนการทดลอง เช่นเดียวกับการศึกษาในขั้นต้น เลือกสภาวะที่เหมาะสมที่สุดเพื่อนำไปศึกษาในขั้นต่อไป

5) ศึกษาปริมาณการเติมน้ำกลั่นที่เหมาะสม

ทำการทดลองเช่นเดียวกับการศึกษาในขั้นต้น โดยศึกษาความชื้นเริ่มต้น 3 ระดับ คือ 1) ไม่เติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 2) เติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 2 % และ 3) เติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 4 % การควบคุมสภาวะการหมัก การสุ่มตัวอย่างมาวิเคราะห์ และการวางแผนการทดลอง ดำเนินการเช่นเดียวกับการศึกษาในขั้นต้น เลือกสภาวะที่เหมาะสมที่สุดเพื่อนำไปศึกษาในขั้นต่อไป

**3.4.4 ศึกษาการทำให้น้ำเชื่อมข้าวเข้มข้น**

ในการทำไซรัปข้าวนั้นจำเป็นต้องหาความเข้มข้นของของแข็งที่ละลายได้ที่เหมาะสม เพื่อที่จะได้ยืดอายุการเก็บรักษาให้ยาวนานที่สุด ซึ่งการทดลองนี้ได้เลือกใช้การระเหยแบบ Pan evaporation โดยนำน้ำเชื่อมข้าวไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ในกะทะทองเหลือง และเก็บตัวอย่างไซรัปข้าวที่มีปริมาณของของแข็งเป็น 60 70 และ 80 ˚Brix จากนั้นนำไปวิเคราะห์คุณภาพทางด้าน กายภาพ เคมี และจุลินทรีย์ ดังนี้ (ชิดชัย ปัญญาสวรรค์, 2547)

1) คุณภาพทางกายภาพ

(1) ความหนืดด้วยเครื่องวัดความหนืด (Brookfield viscometer)

(2) ค่าสีในระบบ CIE L* a* b* ด้วยเครื่อง Handy Colorimeter

2) คุณภาพทางเคมี

(1) ค่าพีเอช ด้วยเครื่อง pH meter

(2) ปริมาณน้ำตาลกลูโคส โดยวิธี DNS Method

(3) ปริมาณกรดทั้งหมด (Total acidity ) (AOAC, 2000)

3) คุณภาพทางจุลินทรีย์

(1) จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total plate count) (AOAC, 2000)

(2) จำนวนยีสต์และรา (Yeast and mold) (AOAC, 2000)

**3.4.5 วิเคราะห์ข้อมูลและสรุปผล**

วางแผนการทดลองแบบ CRD วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป วิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan ’s Multiple Rang Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95%

## 3.5 . ระยะเวลาที่ทำการวิจัย

ก.พ. 2549 – มี.ค. 2550

## 3.6 สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาและเคมีอาหาร หลักสูตรวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต