

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์

วัตถุดิบ

- ข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 กข10 และเหนียวสันป่าตอง จากสถานีทดลองข้าวสันป่าตอง อ. สันป่าตอง จ. เชียงใหม่
- ลูกแป้งสุรจาก อำเภอ สันทราย จังหวัด เชียงใหม่
- ลูกแป้งสุรจาก อำเภอ พาน จังหวัด เชียงราย
- ลูกแป้งสุรจาก อำเภอ สอง จังหวัด แพร่

อุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิตสุรกลั่น

- เครื่องสีข้าว (ผลิตภายในประเทศ)
- ตู้บ่มอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส
- ตู้แช่เย็นอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส
- ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส
- เครื่องขังธรรมชาติ (ผลิตภายในประเทศ)
- เครื่องชั่งไฟฟ้า ทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Shimadzu , Model "BX-420H")
- เครื่องแก้วกลั่นแบบธรรมชาติ (ผลิตภายในประเทศ)
- เตาให้ความร้อนไฟฟ้า (hot plate)

อุปกรณ์ที่ใช้วิเคราะห์คุณภาพ

อุปกรณ์ที่ใช้วิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์

- เครื่องฆ่าเชื้อ autoclave (Gallenkamp)
- ตู้บ่มอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Gallenkamp, size two)
- ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Gallemkamp)
- Counting Chamber (Boeco, deep 1/10 mm ผลิตในประเทศเยอรมัน)

- Stirring (Vortex-Genid, Model "K-550-GE")
- เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Storius, Model "A120S")

อุปกรณ์ที่ใช้วิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ

- เครื่องความแน่นเนื้อ (Hunter, Model "5565")
- เครื่องวัดสี (Hunterlab, ColorQuest II)
- เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ("Beckman" Model DU 7500, Beckman Co., Ltd., USA)
- Micrometer (Starrett, Model "208M")

อุปกรณ์ที่ใช้วิเคราะห์คุณภาพทางเคมี

- alcohol meter (ผลิตในประเทศไทย)
- Ebulliometer ("Dujardin Salleron" ผลิตในประเทศฝรั่งเศส)
- ขวดหาความถ่วงจำเพาะ
- เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด ("Hand Refractometer" Model 507 – 1, Nippon Optical Work., Japan)
- เครื่องวิเคราะห์ไขมันเครื่อง Soxtec Avanti 2050 (Automatic Extration System)
- เครื่องกลั่นโปรตีน (Buchi, Model 323)
- Gas Chromatography (SHIMADZU, Model 'GC-15APF&C-R4A')
- Atomic Absorption Spectrophotometer (Perkin-Elmer, Model 3100)
- pH (Hana instrument, Model "HI 9321")

เครื่องประมวลผลข้อมูล

- เครื่องไมโครคอมพิวเตอร์ส่วนบุคคล
- โปรแกรมสำเร็จรูป Statistic for Window
- โปรแกรมสำเร็จรูป Excel

3.2 วิธีการทดลอง

การศึกษาคุณภาพของสุรากลั่นพื้นบ้านที่ผลิตในเขตภาคเหนือตอนบน แบ่งการวิจัยออกเป็น 4 ขั้นตอนดังนี้

ตอนที่ 1 การตรวจสอบลูกแป้งสุรา (นิตยา, 2532 ; Harrigan *et al.*, 1966 ; AOAC, 1995)

ก. ศึกษาคุณสมบัติทางด้านจุลินทรีย์

(1) การตรวจนับปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด นำตัวอย่างมาทำให้เจือจางแล้วตรวจนับปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดโดยวิธี pour plate โดยใช้อาหาร Standard Plate count agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญ (Harrigan *et al.*, 1966)

(2) การตรวจนับปริมาณเชื้อราและเชื้อยีสต์ นำตัวอย่างมาทำให้เจือจางแล้วตรวจนับปริมาณยีสต์และราทั้งหมดรวมกันโดยวิธี pour plate โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) ปรับ pH ด้วย 10% tartaric acid บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ. เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญ (Harrigan *et al.*, 1966)

(3) การตรวจนับปริมาณแบคทีเรียบาซิลลัส นำตัวอย่างมาทำให้เจือจาง นำไปต้มในน้ำร้อน 100 °ซ. นาน 3 นาที แล้วแช่น้ำเย็นทันที นำมาตรวจนับปริมาณแบคทีเรียบาซิลลัสโดยวิธี Spread plate ใช้อาหาร Standard plate count agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ. ตรวจนับปริมาณโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญ (นิตยา, 2532)

(4) ตรวจนับปริมาณแบคทีเรียแลคติก นำตัวอย่างมาทำให้เจือจาง ตรวจนับปริมาณแบคทีเรียแลคติกโดยวิธี pour plate และทำ over layer plate ใช้อาหาร MRS agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ. นับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญ (Harrigan *et al.*, 1966)

(5) ตรวจนับปริมาณ *Acetobacter sp.* นำตัวอย่างมาทำให้เจือจาง ตรวจนับปริมาณ *Atecobacter sp.* โดยวิธี Spread plate ใช้อาหาร Bromcresol green ethanol yeast extract agar บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ. นับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญเป็นสีน้ำเงิน บนพื้นอาหารที่เปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีเหลือง (Harrigan, 1976) (วิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ ดูภาคผนวก ค.)

(6) ถ่ายภาพเชื้อจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย ยีสต์และรา จากกล้องจุลทรรศน์ (Nikon, Model FX-35XD)

ข. ศึกษาคุณสมบัติทางเคมี (AOAC, 1995)

- นำตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณความชื้น
- ปริมาณโปรตีน (Macro-Kjedahl method, Crude protein %)
- ไขมัน (Direct extract method, Crude fat %)
- คาร์โบไฮเดรต (Kirk and Sawyer, 1991)
- เถ้า (total ash)
- น้ำตาลรีดิวซ์ (DNS method) (Miller *et al.*, 1960)
- กรดทั้งหมดในรูปของกรดแลคติก (total acidity as % lactic acid)
- พีเอช (ความเป็นกรด – ต่าง , final pH)

ค. ตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพ

- ค่าสี Hunter โดยเครื่อง ColorQuest II (AOAC, 1995)
- ความแน่นเนื้อของลูกแป้ง โดยเครื่อง Instron, Model "5565" (AOAC, 1995)
- กลิ่น โดยวิธี sensory taste เชงพรรณนา (ไพโรจน์³, 2536)

ตอนที่ 2 การตรวจสอบพันธุ์ข้าว 3 พันธุ์

ก. ตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพ (AACC, 1977) (รายละเอียดในภาคผนวก ค.)

- ขนาดของเมล็ด
- ตรวจหาน้ำหนักเมล็ด 1,000 เมล็ด
- ความชื้น ตามวิธีของศูนย์วิจัยข้าวแพร่
- ตรวจสอบน้ำหนักข้าวหลังจากแช่น้ำ 12 ชม. และน้ำหนักข้าวหลังจากนึ่งแล้ว (Loesbeck, 1955)

ข. ตรวจสอบคุณสมบัติทางเคมี (AACC, 1977)

- คาร์โบไฮเดรต (Kirk and Sawyer, 1991)
- โปรตีน (Macro-Kjedahl method, Crude protein %)
- ไขมัน (Direct extract method, Crude fat %)
- ปริมาณเถ้า (Total ash)

ตอนที่ 3 ทดลองกระบวนการหมักแอลกอฮอล์และการตรวจสอบคุณภาพสุรากลั่นจากข้าวเหนียว 3 พันธุ์กับลูกแป้ง 3 ชนิด

ทำการทดลอง 2 ซ้ำ นำข้าว 3 พันธุ์ คือ กข6 กข10 และเหนียวสันป่าตอง มาทำการผลิตสุรากลั่นลูกแป้งจาก 3 แหล่ง คือ อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ อำเภอพาน จังหวัดเชียงราย และ อำเภอสอง จังหวัดแพร่ ดังตารางที่ 3.1

ก. ตรวจสอบกระบวนการหมัก

วิธีการหมักมีดังนี้ ตรวจสอบกระบวนการหมัก โดย นำวัตถุดิบคือ ข้าวและลูกแป้งมาหมักด้วยกรรมวิธีในบ่อที่ 1 ทำการแบ่งบรรจุในขวดแก้ว (ขวดแยม) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 นิ้ว สูง 3.5 นิ้ว ในอัตราส่วนเดียวกันกับกรรมวิธีในบ่อที่ 1 แต่ปรับเป็นปริมาณน้อยคือข้าวเหนียวสุกผสมลูกแป้งบดละเอียด 85 กรัมต่อ 1 ขวด (in small-mass tests, Kadokura *et al.*, 1995) ปิดฝาให้

ครบ 7 วันเติมน้ำ 100 มิลลิลิตร หน่วยการทดลองละ 14 ขวด ป่มที่ 30^oซ. ทำการตรวจสอบทุก 24 ชม. เป็นระยะเวลาทั้งหมด 336 ชม. (14 วัน) ทำการตรวจวัด ดังนี้

ก.1 การตรวจสอบทางเคมี

- ปริมาณแอลกอฮอล์โดย Ebuliometer
- น้ำตาลรีดิวิง (DNS method)
- กรดทั้งหมดในรูปของกรดแลคติก (total acidity as lactic acid, AOAC, 1995)
- กรดที่ระเหยได้ในรูปกรดอะซิติก (total acidity as acetic acid, AOAC, 1995)
- พีเอช (final pH , AOAC 1995)
- ของแข็งที่ละลายน้ำได้ (^oBrix) โดย Hand refractometer
- ปริมาณยีสต์ (Total Count Mehtod, Harrigan *et al.*, 1966)

(รายละเอียดดูในภาคผนวก ค.)

ก. 2 การวิเคราะห์ทางสถิติ (จรัญ, 2534)

- วางแผนการทดลองแบบ RBD Factorial (Randomized Blocks Design) ข้อมูลที่ได้จากการทดลองทั้งหมดนำมาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม Statistic for Window เพื่อทราบถึงความแตกต่างของพันธุ์ข้าวและลูกแบ่งที่ให้คุณภาพของสุรากลั่นที่ดีที่สุด

ตารางที่ 3.1 สรุปการวางแผนการทดลองในตอนี่ 3

หน่วยทดลอง	ปัจจัยที่ 1 (พันธุ์ข้าว)	ปัจจัยที่ 2 (แหล่งลูกแบ่ง)
1	ข้าว กข6	อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่
2	ข้าว กข6	อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่
3	ข้าว กข6	อำเภอฮ้าง จังหวัดแพร่
4	ข้าว กข10	อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่
5	ข้าว กข10	อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่
6	ข้าว กข10	อำเภอฮ้าง จังหวัดแพร่
7	ข้าว เหนียวสันป่าตอง	อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่
8	ข้าว เหนียวสันป่าตอง	อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่
9	ข้าว เหนียวสันป่าตอง	อำเภอฮ้าง จังหวัดแพร่

ข. ตรวจสอบคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์สุรากลั่น

อัตราส่วนลูกแป้งต่อข้าวสารเหนียว ลูกแป้ง 1 ลูก ต่อข้าวสารเหนียว 1 ลิตร ปกติจะหมักในภาชนะ เช่น หม้อดิน, ถังน้ำ, ซึ่ง 1 หม้อ หรือ 1 ถัง จะใช้ข้าวสารเหนียว 5 ลิตร ลูกแป้ง 5 ลูก

วิธีการหมัก

(1.1) นำข้าวสารเหนียวแช่น้ำไว้ 12 ชม. นำไปนึ่งให้สุก

(1.2) นำข้าวเหนียวสุกล้างน้ำจนหมดความเหนียว คือ จนเมล็ดข้าวร่วงเป็นเม็ดๆ ไม่เกาะติดกัน (1.3) นำข้าวเหนียวสุกตามข้อ (2) คลุกกับลูกแป้งซึ่งได้บดละเอียดเป็นผงไว้ก่อนแล้ว

(1.4) ใส่ในภาชนะที่เตรียมไว้คือขวดโหลแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 7.5 นิ้ว สูง 9 นิ้ว โดยอัดให้แน่น แล้วทำตรงกลางให้เป็นรูตั้งแต่ส่วนบนข้าวเหนียวจนถึงก้นภาชนะ รูนี้เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 นิ้ว

(1.5) นำฝาปิดให้แน่น

(1.6) ทิ้งไว้ 7 วัน เติมน้ำต้มสุกในอัตราส่วน 3:5 (ข้าวสารเหนียว 3 ลิตร ต่อน้ำสุก 5 ลิตร) ปิดภาชนะให้แน่น ทิ้งไว้อีก 7 วัน นำไปกลั่น โดยเครื่องกลั่นแบบธรรมดา (direct distillation) (ดูรายละเอียดในภาคผนวก ค.)

ข.1 ตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพ (Physical analysis)

- ค่าสี Hunter โดยเครื่อง ColorQuest II (AOAC, 1995)
- ค่าความตวงจำเพาะ (AOAC, 1995)
- ความขุ่น (Hsu, 1990)

ข. 2 ตรวจสอบคุณสมบัติทางเคมี (Chemical analysis)

- ปริมาณเอทานอล ด้วย alcohol meter
- สิ่งที่เหลือจากการระเหย (AOAC, 1995)
- กรดทั้งหมด (ในรูปของกรดอะซิติก) (AOAC, 1995)
- กรดระเหย (ในรูปของกรดอะซิติก) (AOAC, 1995)

- เอสเทอร์ (ในรูปของ ethyl acetate โดยเครื่อง GC, SHIMADZU, Model 'GC-15APF&C-R4A')
- อัลดีไฮด์ (ในรูปของ acetaldehyde โดยเครื่อง GC, SHIMADZU, Model 'GC-15APF&C-R4A')
- ฟิวเซลอลกอฮอล์ (ในรูปของ n-propyl alcohol, Isobutyl alcohol และ amyl alcohol โดยเครื่อง GC, SHIMADZU, Model 'GC-15APF&C-R4A')
- เมธานอล (โดยเครื่อง GC, SHIMADZU, Model 'GC-15APF&C-R4A')
- ฟีนอล (ความเป็นกรด-ด่าง)
- ทองแดง (โดยเครื่อง AAS, Perkin-Elmer, Model 3100)
- ตะกั่ว (โดยเครื่อง AAS, Perkin-Elmer, Model 3100)

ข.3 การวิเคราะห์ทางสถิติ (จรัญ, 2534)

- ข้อมูลที่ได้จากการทดสอบทั้งหมดนำมาวิเคราะห์ทางสถิติแบบ CRD (Complete Randomized Design) ด้วยโปรแกรม Statistic for Window เพื่อทราบถึงความแตกต่างของพันธุ์ข้าวและลูกแบ่งที่ให้คุณภาพของสุรากลั่นที่ดีที่สุด

ตอนที่ 4 การวิเคราะห์และตรวจสอบคุณสมบัติของสุรากลั่นที่ผลิตในเขตภาคเหนือตอนบน

ทำการศึกษาเปรียบเทียบกับสุรากลั่นที่ผลิตจากโรงงานสุราที่ได้รับอนุญาตจากกรมสรรพสามิต และสุรากลั่นพื้นเมืองจากจังหวัดเชียงใหม่ จังหวัดเชียงราย จังหวัดลำปาง จังหวัดแพร่ และจังหวัดพะเยา ที่ไม่ได้ขออนุญาตจากกรมสรรพสามิต นำตัวอย่างทั้งหมดมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบต่างๆดังต่อไปนี้ (ดูรายละเอียดในภาคผนวก ค.)

ก. ตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพ (Physical analysis)

- ค่าสี Hunter โดยเครื่อง ColorQuest II
- ค่าความถ่วงจำเพาะ (AOAC , 1995)
- ความชื้น (Hsu, 1990)

ข. ตรวจสอบคุณสมบัติทางเคมี (Chemical analysis)

- ปริมาณเอทานอล ด้วย alcohol meter
- สิ่งที่เหลือจากการระเหย (AOAC, 1995)
- กรดทั้งหมด (ในรูปของกรดอะซิติก) (AOAC, 1995)
- กรดระเหย (ในรูปของกรดอะซิติก) (AOAC, 1995)
- เอสเทอร์ (ในรูปของ ethyl acetate โดยเครื่อง GC, SHIMADZU, Model 'GC-15APF&C-R4A')
- อัลดีไฮด์ (ในรูปของ acetaldehyde โดยเครื่อง GC, SHIMADZU, Model 'GC-15APF&C-R4A')
- พิวเซลอลอยล์ (ในรูปของ n-propyl alcohol, isobutyl alcohol และ amyl alcohol โดยเครื่อง GC, SHIMADZU , Model 'GC-15APF&C-R4A')
- เมธานอล (โดยเครื่อง GC, SHIMADZU, Model 'GC-15APF&C-R4A')
- ฟีเอช (ความเป็นกรด-ด่าง)
- ทองแดง (โดยเครื่อง AAS, Perkin-Elmer, Model 3100)
- ตะกั่ว (โดยเครื่อง AAS, Perkin-Elmer, Model 3100)

นำผลการวิเคราะห์ที่ได้ทั้งทางกายภาพ และทางเคมีมาวิเคราะห์ผลทางสถิติแบบ CRD (Complete Randomized Design) โดยใช้โปรแกรม Statistic for Window เพื่อทราบความแตกต่างของสุราในแต่ละแหล่งการผลิต