บทที่ 3
วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุ

3.1.1 วัตถุดิบ

เป็นเมล็ดข้าวโพดหวานพันธุ์ Hybrix 3 ได้มาจาก 3 จุด คือ

1. เมล็ดที่ฝานจากข้าวโพดตกเกรด
2. ส่วนเหลือจากเครื่องคัดแยกเมล็ด
3. ส่วนเหลือจากเครื่องล้างและร่อนเมล็ด

3.1.2 จุลินทรีย์

1. ลูกแป้งสุราจากอำเภอเมือง จังหวัดลำปาง ซึ่งที่มีส่วนประกอบที่สำคัญคือ ข่า ดีปลี กระเทียม เป็นหลัก

2. ลูกแป้งสุราจากอำเภอเมืองปาน จังหวัดลำปาง ซึ่งที่มีส่วนประกอบที่สำคัญคือ ข่า พริกแห้ง ดีปลี เป็นหลัก

3. ลูกแป้งสุราจากอำเภอวังเหนือ จังหวัดลำปาง ซึ่งที่มีส่วนประกอบที่สำคัญคือ พริกแห้ง กระเทียม ดีปลี เป็นหลัก

4. ยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ทางการค้า Fermivin PDM, V1116 (หจก. โอ. วี. เคมิคอล แอน ซัพพลาย จังหวัดเชียงใหม่) และ Bougoblanc CY 3079 (Lallemand Inc., Montreal Canada)

5. เชื้อรา สายพันธุ์ *Aspergillus oryzae* และสายพันธุ์ *Aspergillus niger* (จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย)

3.1.3 เอนไซม์

1. Termamyl SC (Novozymes, Denmark) ซึ่งเป็นเอนไซม์อัลฟาอะไมเลส (ภาคผนวก ฉ)

2. AMG 300 L (Novozymes, Denmark) ซึ่งเป็นเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส (ภาคผนวก ฉ)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 อุปกรณ์

3.2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิตสุรากลั่น

1. หม้ออะลูมิเนียมขนาด 30 x 30 เซนติเมตร
2. ทัพพี
3. ถังน้ำขนาด 6 ลิตร
4. เครื่องปั่นไฟฟ้า (Moulinex, France)
5. เครื่องชั่งแขนเดียว (Tokumoto, Japan)
6. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 3 ตำแหน่ง (Sartorius GMBH Gottingen, Germany)
7. เตาแก๊ส
8. ชุดเครื่องกลั่นสุรา (ผลิตจากห้างหุ้นส่วนโคราชทรีท เคมิคอล จำกัด)
9. Dial thermometer, Model 6235 (Taylor, USA)

3.2.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพ

1. กระบอกตวงขนาด 100 มิลลิลิตร (EM Techcolor, Germany)
2. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 3 ตำแหน่ง (Sartorius GMBH Gottingen, Germany)
3. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 3 ตำแหน่ง (Precisa, XT 320M)
4. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven, Memmert, Model 600)
5. เครื่องกลั่นโปรตีน (Buchi, Model 323)
6. pH meter (Hanna Instrument, Model 8417, Portugal)
7. อีบูลิโอมิเตอร์ (Ebuliometer, Dujardin salleron, France)
8. เครื่องแก้ว (EM Techcolor, Germany)
9. Hand refractometer (Tamco, Taiwan)
10. เตาไฟฟ้า (Hot plate, E.G.O. Elektro-Geratebau GMBH, Germany)

3.3 สารเคมี

1. Potassium Sodium Tartate, Asia Pacific Specialty Limited
2. Sodium hydroxide, Merck
3. Copper sulphate, Merck
4. Zinc ferrocyanide, Asia Pacific Specialty Limited
5. Zinc acetate dihydrate, Asia Pacific Specialty Limited
6. Glacial acetic acid, Merck
7. Potassium ferrocyanide, Merck
8. Hydrochloric acid, Merck
9. Methylene blue indicator, Merck

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

10. Phenolpthaline, Merck
11. Diethyl ether, Merck
12. Petroleum ether, Merck
13. Bacto ^{TM} Agar, Becton, Dickinson and Company, USA
14. D (+) - Glucose monohydrate, Merck

3.4 วิธีการทดลอง

การศึกษาคุณภาพของส่วนเหลือข้าวโพดหวานที่ได้จากการผลิตข้าวโพดหวานบรรจุกระป๋อง การย่อยแป้ง และการหมักต่อคุณภาพของสุรากลั่น แบ่งการวิจัยออกเป็น 6 ขั้นตอนดังนี้

3.4.1 ศึกษาคุณภาพของส่วนเหลือข้าวโพดหวาน

ทำการศึกษาคุณภาพต่างๆของส่วนเหลือจำนวน 3 ซ้ำ โดยมีการศึกษาดังนี้

3.4.1.1 สัดส่วนของข้าวโพดหวานที่ผ่านกระบวนการผลิต

1. นำเอาข้าวโพดหวานที่ทราบน้ำหนัก ผ่านเครื่องลวก แล้วผ่านเครื่องปอกเปลือก (husker) (ผลิตในประเทศ) และนำมาหาน้ำหนักข้าวโพดที่ได้หลังการปอกเปลือก เปลือกกับไหม และข้าวโพดตกเกรดที่คัดออกโดยพนักงาน แล้วคำนวณเทียบกับน้ำหนักข้าวโพดหวานหลังลวก เพื่อหาสัดส่วนข้าวโพดที่ได้หลังปอกเปลือก

2. นำข้าวโพดตกเกรดที่คัดออกมาฝานเมล็ดด้วยมีดโดยพนักงาน เพื่อนำมาหาส่วนเมล็ดที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการศึกษาได้

3. นำเอาข้าวโพดปอกเปลือกฝักดีมาฝานเอาเฉพาะเมล็ดโดยใช้เครื่องฝานเมล็ด (corn cutter) (ผลิตในประเทศ) แล้วนำมาผ่านเครื่องคัดแยกเมล็ด เพื่อแยกเอาส่วนที่เป็นส่วนที่แตก เศษซัง เศษไหม ชั่งเมล็ดข้าวโพดหวานที่ได้หลังทำการล้างน้ำ และและชั่งน้ำหนักส่วนเหลือที่ได้จากเครื่องคัดแยกเมล็ด เพื่อหาสัดส่วนข้าวโพดที่ได้เมื่อผ่านเครื่องฝานเมล็ด (corn cutter) และเครื่องคัดแยก

4. นำเมล็ดทีได้หลังผ่านเครื่องคัดแยกเมล็ด นำมาผ่านเครื่องล้างและร่อนเมล็ด ชั่งน้ำหนัก เมล็ดที่ดีส่วนที่บรรจุลงกระป๋อง และชั่งน้ำหนักส่วนเหลือที่ได้จากเครื่องล้างและร่อนเมล็ด เพื่อหาสัดส่วนข้าวโพดที่ได้เมื่อผ่านเครื่องล้างและร่อนเมล็ด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4.1.2 ศึกษาคุณภาพทางเคมีของส่วนเหลือข้าวโพดหวาน

จากส่วนเหลือในแต่ละส่วนปั่นละเอียดจากนั้นทำการศึกษาคุณภาพ ดังนี้

- หาความชื้น โดยวิธีการใช้ตู้อบลมร้อน (AOAC, 2000)
- โปรตีน โดยวิธี Kjedahl Method (AOAC, 2000)
- ไขมัน โดยวิธี Rose-Gottlirb (AOAC, 2000)
- เถ้า โดยวิธีเผาตัวอย่างที่อุณหภูมิ 525-550°ซ (AOAC, 2000)
- คาร์โบไฮเดรต โดยการคำนวณ (AOAC, 2000)
- ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Lane & Eynon (AOAC, 2000)

โดยการวางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) วิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้ ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

3.4.2 ศึกษาการใช้ลูกแป้งสุราในการย่อยแป้ง และหมักให้เกิดแอลกอฮอล์

นำเอาส่วนเหลือของข้าวโพดหวานที่ได้จากข้อ 3.4.1 นำมานึ่งให้สุกด้วยลังถึง แล้วบดหยาบ ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น ชั่งน้ำหนักอย่างละ 2 กิโลกรัม จากนั้นทำการผสมลูกแป้งสุราที่บดละเอียดแล้วที่จัดหามาจาก 3 ชนิดได้แก่ ลูกแป้งจากอำเภอเมือง จังหวัดลำปาง ลูกแป้งจากอำเภอเมืองปานจังหวัดลำปาง และลูกแป้งจากอำเภอวังเหนือ จังหวัดลำปาง ในอัตราส่วนข้าวโพดหวานบด 1 กิโลกรัมต่อลูกแป้ง 1 ลูก ทำการทดลองอย่างละ 3 ซ้ำ ปล่อยให้มีการเจริญของเชื้อในสภาพอุณหภูมิห้องนาน 5 วัน แล้วเติมน้ำสะอาดลงไป 1 เท่าของน้ำหนักข้าวโพดหวานบด ปล่อยให้หมักในสภาพอุณหภูมิห้อง จนไม่มีฟองแก๊ส ในระหว่างการย่อยและการหมัก ทำการตรวจผลทุกๆ 3 วัน และจนสิ้นสุดการหมัก ดังนี้

1) ปริมาณแอลกอฮอล์ โดยใช้ Ebulliometer (Patrick and others, 2000)
2) ค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้ pH meter (Hanna Instrument, Model 8417)
3) ปริมาณกรดทั้งหมด (ในรูปกรดแลคติค) โดยใช้วิธีการไตเตรต (AOAC, 2000)
4) ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ โดยใช้ Hand refractometer (Tamco, Taiwan)
5) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้วิธี Lane & Eynon (AOAC, 2000)

เปรียบเทียบคุณภาพต่างๆในระหว่างการย่อยและการหมัก โดยการวางแผนการทดลองแบบ 3×3 Factorial in CRD (Completely Randomized Design) โดยมีปัจจัยต่างๆ ดังนี้ ปัจจัยที่ 1 คือ แหล่งข้าวโพดหวาน ปัจจัยที่ 2 คือแหล่งลูกแป้ง และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4.3 ศึกษาการย่อยแป้งด้วยเชื้อรา แล้วหมักต่อให้เกิดแอลกอฮอล์โดยเชื้อยีสต์บริสุทธิ์

นำข้าวโพดหวานในข้อ 3.4.1 ที่นึ่งจนสุกด้วยลังถึงแล้วบดหยาบ แล้วผึ่งทิ้งไว้ให้เย็น ชั่งน้ำหนักอย่างละ 1 กิโลกรัม หลังจากนั้นทำการคลุกกล้าเชื้อราที่เตรียมไว้ (ภาคผนวก ค) ในงานวิจัยใช้เชื้อราสายพันธุ์ *Aspergillus oryzae* และ *Aspergillus niger* โดยทำการคลุกเชื้อรา 1 สายพันธุ์ต่อข้าวโพดหวานสุกบดหยาบ 1 กิโลกรัม เพาะที่อุณหภูมิห้องไว้นาน 4 วันโดยสังเกตเห็นว่ามีน้ำหมักเกิดขึ้น เติมน้ำสะอาดลงไป 1 เท่าของน้ำหนักข้าวโพดหวานบด ถ่ายเชื้อยีสต์บริสุทธิ์ทางการค้าชนิดผง 3 สายพันธุ์ที่เตรียมไว้ (ภาคผนวก ค) ได้แก่ Fermivin PDM, V1116 และ Bourgoblanc โดยใส่จำนวน 0.2 กรัมต่อข้าวโพดหวาน 1 กิโลกรัม ปล่อยให้หมักในสภาพอุณหภูมิห้อง ในระหว่างการย่อยและการหมัก ทำการตรวจผลทุกๆ 3 วัน และจนสิ้นสุดการหมัก ดังข้อ 3.4.2

เปรียบเทียบคุณภาพต่างๆในระหว่างการย่อยและการหมัก โดยการวางแผนการทดลองแบบ 3×2 ×3 Factorial in CRD (Completely Randomized Design) โดยมีปัจจัยต่างๆ ดังนี้ ปัจจัยที่ 1 คือแหล่งข้าวโพดหวาน ปัจจัยที่ 2 คือชนิดเชื้อรา ปัจจัยที่ 3 คือชนิดยีสต์ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

3.4.4 ศึกษาการนึ่งข้าวโพดหวานให้สุก และบดหยาบแล้วย่อยแป้งด้วยเอนไซม์ และหมักให้เกิดแอลกอฮอล์โดยเชื้อยีสต์บริสุทธิ์

นำข้าวโพดหวานในข้อ 3.4.1 นึ่งให้สุกด้วยลังถึง แล้วผสมน้ำร้อน 1 เท่าตัว เติมเอนไซม์ Termamyl SC จำนวน 0.45 กรัมต่อข้าวโพดหวานบด 1 กิโลกรัม ให้ความร้อนจนอุณหภูมิได้ 98°ซ แล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้อง ใช้เวลาประมาณ 30 นาที เมื่ออุณหภูมิได้ 75°ซ เติมเอนไซม์ AMG 300 L จำนวน 0.46 กรัมต่อข้าวโพดหวานบด 1 กิโลกรัม ที่ค่าความเป็นกรดเป็นด่างที่ 4.0–6.0 วางไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้เวลาประมาณ 2-3 ชั่วโมง เติมหัวเชื้อยีสต์ผงสายพันธุ์ทางการค้า 3 สายพันธุ์ที่เตรียมไว้ โดยใส่จำนวน 0.2 กรัมต่อข้าวโพดหวานบด 1 กิโลกรัม (ภาคผนวก ค) ได้แก่ Fermivin PDM, V1116 และ Bourgoblanc ปล่อยให้หมักที่สภาวะอุณหภูมิห้อง ในระหว่างการย่อยและการหมัก ทำการตรวจผลทุกๆ 3 วัน และจนสิ้นสุดการหมัก ดังข้อ 3.4.2

เปรียบเทียบคุณภาพต่างๆในระหว่างการย่อยและการหมัก โดยการวางแผนการทดลองแบบ 3×3 Factorial in CRD (Completely Randomized Design) โดยมีปัจจัยต่างๆ ดังนี้ ปัจจัยที่ 1 คือ แหล่งข้าวโพดหวาน ปัจจัยที่ 2 คือชนิดยีสต์ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.4.5 ศึกษาผลของการบดข้าวโพดหวานให้ละเอียด และต้มให้สุกแล้วย่อยแป้งด้วยเอนไซม์และหมักให้เกิดแอลกอฮอล์โดยเชื้อยีสต์บริสุทธิ์

นำส่วนเหลือข้าวโพดหวานในข้อ 3.4.1 ผสมน้ำสะอาด 1 เท่าตัว บดละเอียด เติมเอนไซม์ Termamyl SC จำนวน 0.45 กรัมต่อข้าวโพดหวานบด 1 กิโลกรัม ต้มให้เดือดจนข้าวโพดหวานสุก โดยมีอุณหภูมิ 98°ซ วางไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที เมื่ออุณหภูมิได้ 75°ซ เติมเอนไซม์ AMG 300 L จำนวน 0.46 กรัมต่อข้าวโพดหวานบด 1 กิโลกรัม ที่ค่าความเป็นกรดเป็นด่างที่ 4.0–6.0 โดยปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลายกรดซิตริกความเข้มข้น 10% วางไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้เวลาประมาณ 2-3 ชั่วโมง เติมหัวเชื้อยีสต์ผง สายพันธุ์ทางการค้า 3 สายพันธุ์ที่เตรียมไว้ (ภาคผนวก ค) ได้แก่ Fermivin PDM, V1116 และ Bourgoblanc โดยใส่จำนวน 0.2 กรัมต่อข้าวโพดหวานบด 1 กิโลกรัม ปล่อยให้หมักที่สภาวะอุณหภูมิห้อง ในระหว่างการย่อยและการหมัก ทำการตรวจผลทุกๆ 3 วัน และจนสิ้นสุดการหมัก ดังข้อ 3.4.2

เปรียบเทียบคุณภาพต่างๆในระหว่างการย่อยและการหมัก โดยการวางแผนการทดลองแบบ 3×3 Factorial in CRD (Completely Randomized Design) โดยมีปัจจัยต่างๆ ดังนี้ ปัจจัยที่ 1 คือ แหล่งข้าวโพดหวาน ปัจจัยที่ 2 คือชนิดยีสต์ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

3.4.6 ศึกษาเปรียบเทียบปริมาณแอลกอฮอล์ที่กลั่นได้

จากวิธีการในข้อ 3.4.2 3.4.3 3.4.4 และ 3.4.5 เลือกวิธีการที่เหมาะสมมาทำการย่อยและการหมักแอลกอฮอล์จากข้าวโพดหวาน แล้วทำการกลั่นด้วยชุดเครื่องกลั่นสุรา (ผลิตจากห้างหุ้นส่วนโคราชทรีท เคมิคอล จำกัด) และการวิเคราะห์และคำนวณหาค่าต่างๆดังนี้

1) ผลผลิตแอลกอฮอล์ที่ได้ (%v/w)

$$= \frac{\{\text{ปริมาณแอลกอฮอล์ที่กลั่นได้ (มล.)}\} \times 100}{\text{น้ำหนักของข้าวโพดหวาน (กรัม)}}$$

2) ปริมาณแอลกอฮอล์ที่กลั่นได้จากน้ำหมัก (%v/v)

$$= \frac{\{\text{ปริมาณแอลกอฮอล์ที่กลั่นได้ (มล.)}\} \times 100}{\text{ปริมาตรแอลกอฮอล์ในน้ำหมักหลังการหมัก (มล.)}}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3) ปริมาณแอลกอฮอล์ที่กลั่นได้จากแป้งในข้าวโพดหวาน (%v/w)

= {ปริมาณแอลกอฮอล์ที่ได้จริง (%)}× 100

ปริมาตรแอลกอฮอล์ที่ได้ตามทฤษฎี (%)

4) ประสิทธิภาพในการผลิตแอลกอฮอล์

= {ปริมาณแอลกอฮอล์ที่ได้จริงจากแป้ง (%)}× 100

ปริมาณแอลกอฮอล์ที่ได้ตามทฤษฎี (%)

3.4.7 การวิเคราะห์สุราขาว

3.4.7.1 นำสุราขาวที่กลั่นได้ปรับแอลกอฮอล์ให้ได้ 35%

3.4.7.2 ทำการตรวจสอบตามมาตรฐานของสุรากลั่น มอก. 2088/2544 คือ หาปริมาณฟลูเซลออยล์ (fusel oil) และเมธานอล (methanol) จากสถานบริการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (สวท-มช.)

3.4.7.3 มีการคำนวณต้นทุนการผลิต (ภาคผนวก ง)

3.4.8 การทดสอบชิม

ทำการทดสอบชิมโดยการชิมแบบ hedonic scale scoring test แบบ 5 points จำนวนผู้ทดสอบชิม 15 คน โดยทำการทดลองแบบ RCBD และวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้ ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ให้คะแนนการทดสอบ ความหอมของกลิ่น ความฉุน รสชาติ ความขม และการยอมรับโดยรวม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved