

บทที่ 3

การทดลอง

วัตถุดิบ

1. เชื้อยีสต์ Saccharomyces cerevisiae ในลักษณะผง (active dry yeast) ของ Universal Foods Corporation Milwaukee, Wisconsin 5320 USA. จำนวน 3 สายพันธุ์ คือ Montrachet, Pasteur Champagne และ Epernay 2 นำเชื้อยีสต์ผงสำเร็จรูปมาทำให้กระจายตัวในน้ำเกลือ 0.8 % แล้วทำ spread plate ทดสอบการปนเปื้อน เลือกโคโลนีที่ตีเก็บบน PDA slant เป็น stock culture เมื่อจะหมักแต่ละครั้ง จะต่อเชื้อจาก stock culture ทุกครั้งเพื่อลดโอกาสการผ่าเหล่า
2. น้ำผึ้งจากดอกงุ่น (Kapok, Bombax ceiba Linn.) เก็บที่อุณหภูมิ 20±1 องศาเซลเซียส โดยได้รับความอนุเคราะห์จาก ศาสตราจารย์ ดร. สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ หัวหน้าหน่วยปฏิบัติการวิจัยผึ้ง ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
3. มะขามเปียก (Tamarindus indica Linn.)
4. กระจี้ยบแห้ง (Hibicus sabdariffa Linn.)
5. น้ำส้มเปรตกระป๋องชนิด 100 % natural ของบริษัทอาหารสยามจำกัด
6. diammonium hydrogen phosphate A.R. grade
7. citric acid Food grade
8. potassium metabisulphite Food grade
9. diatomaceous earth Food grade

สารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมดและกรดระเหย sodium hydroxide A.R. grade

phenolphthalein	A.R. grade
bromthymol blue	A.R. grade
2. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณกลีเซอรอล	
calcium oxide	A.R. grade
ethyl alcohol 90%	A.R. grade
absolute alcohol	A.R. grade
anhydrous ether	A.R. grade
3. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณเอทิลอะซิเตท	
sodium hydroxide	A.R. grade
ethyl alcohol 50 %	A.R. grade
4. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์อะเซทาลดีไฮด์	
sodium bisulfite	A.R. grade
iodine	A.R. grade
sodium thiosulfate	A.R. grade
5. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณ 3-methyl-1-butanol	
3-methyl-1-butanol	A.R. grade

อาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์

1. potato dextrose agar Difco

อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมและวิเคราะห์คุณภาพไวน์น้ำผึ้ง

1. pH meter (Hanna, 8417)
2. ไฮโดรมิเตอร์สำหรับวัดน้ำตาล 3 ช่วงคือ 0-10, 10-20, 20-30 องศาบริกซ์
3. ไฮโดรมิเตอร์สำหรับวัดแอลกอฮอล์ 0-100 เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์
4. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Sanyo, MLS-2400)
5. เครื่องชั่งละเอียด (Sartorius, A 200 S)
6. เครื่องชั่งหยาบ (Sartorius, B 3100 S)

7. เครื่องกลั่นไอน้ำ (Gerhardt, Vapodest 1)
8. ชุดเครื่องกลั่น



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

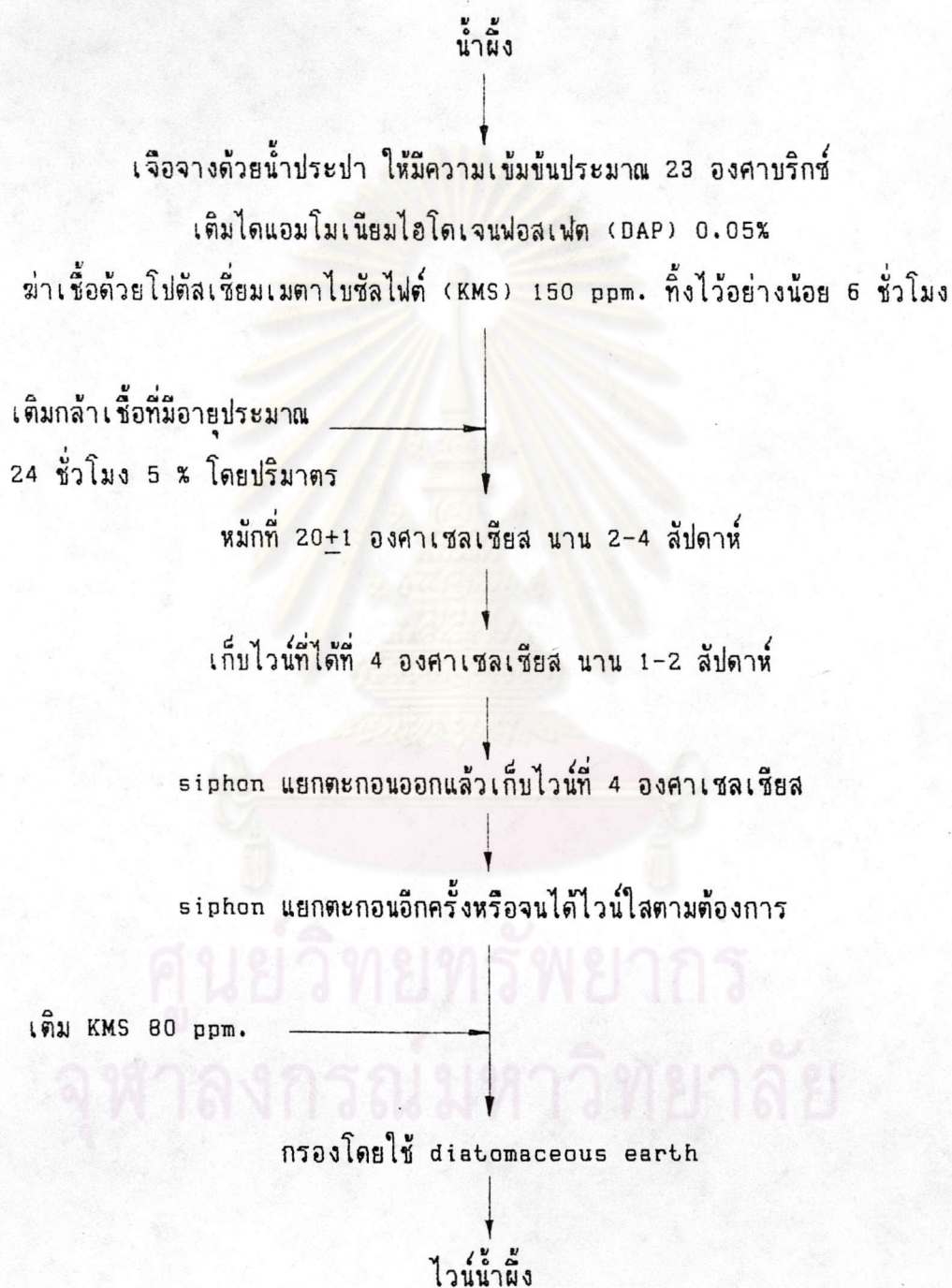
การเตรียมกล้าเชื้อ: เตรียมสารละลายน้ำผึ้งเข้มข้น 20 องศาบริกซ์ เติมไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (DAP) 0.05 % ปริมาณที่เตรียมเท่ากับร้อยละ 5 ของปริมาณน้ำหมักทั้งหมด นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เติมเชื้อยีสต์ 1 loop ต่ออาหารสำหรับกล้าเชื้อปริมาตร 200 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง จึงนำมาใช้

การเตรียมน้ำหมัก: เตรียมสารละลายน้ำผึ้งเข้มข้น 23 องศาบริกซ์ เติม DAP 0.05 % ฆ่าเชื้อด้วยไฮโปคลอไรต์โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ (KMS) 150 ppm. (free SO₂ 75 ppm.) ทิ้งไว้อย่างน้อย 6 ชั่วโมง จึงนำมาใช้ (สมบูรณ์ เติชัญญวรากุล, 2536)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กระบวนการผลิตไว้น้ำผึ้ง (Morse, 1980)

กระบวนการผลิตไว้น้ำผึ้งที่ใช้ในงานวิจัยมีผังดังรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 ผังการผลิตไว้น้ำผึ้ง

ขั้นตอนและวิธีดำเนินการวิจัย

1. วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตไวน์น้ำผึ้งผลไม้

1.1 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำผึ้งนุ่นใต้แก่

- ปริมาณของแข็งที่ละลายที่ได้อุณหภูมิ (°Brix) โดยใช้ hand refractometer
- ความชื้น (ภาคผนวก ก.1)
- เถ้า (ภาคผนวก ก.2)
- ไนโตรเจน โดยใช้วิธี micro-Kjeldahl
- น้ำตาลอินเวิร์ตทั้งหมด โดยใช้วิธี Lane & Eynon
- พีเอช โดยใช้ pH meter
- ความเป็นกรด (คิดในรูปกรดซิตริก) โดยการไตเตรทกับ NaOH 0.1 N

1.2 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของผลไม้ที่ใช้เป็นวัตถุดิบ

- วิเคราะห์ความเป็นกรดของน้ำกระเจี๊ยบ (วิธีเตรียมในภาคผนวก ก.10) คิดในรูปกรดมาลิก โดยการไตเตรทกับ NaOH 0.1 N
- วิเคราะห์ความเป็นกรดของน้ำมะขามเปียก (วิธีเตรียมในภาคผนวก ก.11) คิดในรูปกรดทาร์ทาริก โดยการไตเตรทกับ NaOH 0.1 N
- วิเคราะห์ความเป็นกรดของน้ำสับปะรดคิดในรูปกรดมาลิก โดยการไตเตรทด้วย NaOH 0.1 N วัด pH โดยใช้ pH meter และ วัดปริมาณของแข็งที่ละลายที่ได้อุณหภูมิ (°Brix) โดยใช้ hand refractometer

2. เลือกเชื้อยีสต์ที่เหมาะสมในการหมักไวน์น้ำผึ้ง

2.1 เลือกเชื้อยีสต์ที่เหมาะสมในการหมักไวน์น้ำผึ้ง

โดยใช้เชื้อยีสต์ 3 สายพันธุ์คือ

Saccharomyces cerevisiae var. Montrachet

Saccharomyces cerevisiae var. Pasteur Champagne

Saccharomyces cerevisiae var. Epernay 2

น้ำผึ้งที่ใช้คือน้ำผึ้งนุ่น

- 2.2 เกณฑ์ที่ใช้ในการเลือกเชื้อยีสต์ที่เหมาะสมในการหมักไวน์น้ำผึ้ง
การหมักต้องเกิดขึ้นสูงสุดที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ติดตามการหมักในช่วง 1 เดือน โดยเหลือน้ำตาลรีดิวซ์น้อยที่สุดและได้ร้อยละแอลกอฮอล์สูงสุดติดตามการหมักโดย (Amerine and Ough, 1974 ; Vine, 1981)
- วัดปริมาณองศาบริกซ์ที่เปลี่ยนแปลงโดยใช้ hydrometer
 - วัดปริมาณแอลกอฮอล์ที่เปลี่ยนแปลงโดยใช้ ebulliometer
- 2.3 ติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณกลีเซอรอล, เอทิลอะซิเตท, อะเซทาลดีไฮด์ กรดทั้งหมดและ กรดระเหย ในระหว่างการหมักจนน้ำตาลรีดิวซ์เป็นศูนย์
- วิเคราะห์ปริมาณกลีเซอรอลโดยวิธีระเหยและชั่งน้ำหนัก (ภาคผนวก ก.3)
 - วิเคราะห์ปริมาณเอทิลอะซิเตทโดยวิธีกลั่นและไตเตรทกับ H_2SO_4 0.1 N (ภาคผนวก ก.4)
 - วิเคราะห์ปริมาณอะเซทาลดีไฮด์โดยวิธีกลั่นและไตเตรทกับ $Na_2S_2O_3$ 0.05 N (ภาคผนวก ก.5)
 - วิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมดโดยวิธีกลั่น reflux และไตเตรทกับ NaOH 0.1 N (ภาคผนวก ก.6)
 - วิเคราะห์ปริมาณกรดระเหยโดยวิธีกลั่นด้วยไอน้ำและไตเตรทกับ NaOH 0.1 N (ภาคผนวก ก.7)
 - วิเคราะห์ปริมาณกรดไม่ระเหยโดยวิธีคำนวณ (ภาคผนวก ก.8)
 - ประเมินผลทางประสาทสัมผัสแบบ numerical scoring โดยใช้ผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝน 8 คน (Meilgaard, Civille and Carr, 1990) (ภาคผนวก ข)

วางแผนการทดลองแบบ randomized complete block design ทดลอง

2 ซ้ำ (Cochran and Cox, 1957)

3. ศึกษาปริมาณและชนิดวัตถุดิบที่เหมาะสมในการหมักไวน์น้ำผึ้งผลไม้

3.1 เลือกปริมาณวัตถุดิบที่เหมาะสมในการหมักไวน์น้ำผึ้ง โดยใช้เชื้อยีสต์

สายพันธุ์ที่ได้จากข้อ 2 โดยใช้ผลไม้ 3 ชนิดคือ มะขาม สับปะรด และกระเจี๊ยบ

- กระเจี๊ยบแห้งและมะขามเปียก ปริมาณที่ศึกษามี 3 ระดับ คือ ร้อยละ 1.5, 2.0 และ 2.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร
- น้ำสับปะรดกระป๋อง ปริมาณที่ศึกษามี 3 ระดับ คือ ร้อยละ 10, 20 และ 30 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก

3.2 เกณฑ์ที่ใช้ในการเลือกปริมาณวัตถุดิบที่เหมาะสม ตัดสินโดยการประเมินผลทางประสาทสัมผัสแบบ numerical scoring ใช้ผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝน 8 คน (Meilgard et al., 1990)

3.3 เกณฑ์ที่ใช้ในการเลือกชนิดของวัตถุดิบโดยการวิเคราะห์ปริมาณกลีเซอรอล เอทิลอะซิเตท อะเซทาลดีไฮด์ กรดทั้งหมด กรดระเหย และกรดไม่ระเหย เช่นเดียวกับข้อ 2 และประเมินผลทางประสาทสัมผัสแบบ ranking test ใช้ผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝน 8 คน (Meilgard et al., 1990)

วางแผนการทดลองแบบ randomized complete block design ทดลอง 2 ชั้น (Cochran and Cox, 1957)

4. ศึกษาปริมาณแอลกอฮอล์และปริมาณน้ำตาลสุดท้ายที่เหมาะสมสำหรับไวน์น้ำผึ้งผลไม้อย่างแรง (fortified honey fruit wine)

4.1 คัดเลือกปริมาณแอลกอฮอล์และปริมาณน้ำตาลสุดท้ายที่เหมาะสมสำหรับไวน์น้ำผึ้งผลไม้อย่างแรงที่ได้จากวัตถุดิบและปริมาณที่ใช้จากข้อ 3


- ศึกษาปริมาณแอลกอฮอล์ โดยปรับปริมาณแอลกอฮอล์สุดท้ายเป็น 4 ระดับคือ ไม่ปรับเลย ปรับเป็นร้อยละ 14, 16 และ 18 (v/v) โดยแอลกอฮอล์ที่ใช้ปรับ ได้จากการกลั่นไวน์น้ำผึ้งนั้น ให้มีปริมาณร้อยละแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 75 (ภาคผนวก ก.12)

- ศึกษาปริมาณน้ำตาล โดยปรับปริมาณน้ำตาลสุดท้ายเป็น 4 ระดับคือ ไม่ปรับเลย ปรับเป็นร้อยละ 2, 4 และ 6 (w/v) โดยใช้น้ำเชื่อม

เข้มข้น 65 °Brix

- 4.2 เกณฑ์ที่ใช้ในการตัดสินปริมาณน้ำตาลและแอลกอฮอล์ที่เหมาะสมสำหรับไวน์น้ำผึ้งผลไม้อย่างแรงโดยการวิเคราะห์ปริมาณกลีเซอรอล เอทิลอะซิเตท กรดทั้งหมด กรดระเหย กรดไม่ระเหย เช่นเดียวกับข้อ 2 และ 3-methyl-1-butanol (ภาคผนวก ก.9)

วางแผนการทดลองแบบ symmetric factorial design ขนาด 4x4
ทดลอง 2 ซ้ำ (Cochran and Cox, 1957)



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย