

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัตถุดิบ

1. ผดมะเกี๋ยง (*Cleistocalyx operculatus* var. *paniala*) ผดมะเกี๋ยงที่นำมาใช้เป็นผล แก่จัดมีสีแดงเข้มเกือบม่วง ซึ่งแช่แข็งไว้ที่ -24 องศาเซลเซียส นำมาจากหลายสายต้นรวมกัน
2. เชื้อยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) เชื้อยีสต์ที่ใช้มี 3 สายพันธุ์คือ *montrachet burgundy* และ *bayanus* เชื้อยีสต์ที่นำมาใช้เป็น stock culture นำมา subculture ก่อนที่จะนำมา ใช้โดย streak เชื้อบน PDA slant ในหลอดทดลองที่มีฝาเกลียวปิด บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสประมาณ 24 ชั่วโมง นำมาใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น เชื้อยีสต์ที่ใช้ได้มาจาก สถาบันวิจัย วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ยกเว้น *Bayanus* เป็นเชื้อผง (Active dried yeast) ได้รับความอนุเคราะห์จากงานวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร สถาบันวิจัยและฝึกอบรม การเกษตรลำปาง
3. น้ำผึ้ง (honey) สำหรับในงานวิจัยนี้ใช้ น้ำผึ้งจากต้นสามเสื่อ (*siam weed, Eupatorium odoratum* Linn.) จากสุภาพาร์มผึ้ง อำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่
4. ascorbic acid ของบริษัท FUKUEA Food grade
5. diammonium hydrogen phosphate ของบริษัท J.T. BAKER A.R. grade
6. pectinase ของบริษัท MARKET DRUG Food grade

สารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ในโครเจน

sulfuric acid	A.R. grade
mercuric oxide	A.R. grade
potassium sulfate	A.R. grade
sodium hydroxide	A.R. grade
sodium thiosulfate	A.R. grade
boric acid	A.R. grade
methyl red	A.R. grade
methyl blue	A.R. grade

- | | |
|---|------------|
| hydrochloric acid | A.R. grade |
| 2. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ | |
| potassium iodide | A.R. grade |
| anhydrous sodium bicarbonate | A.R. grade |
| potassium sodium tartrate | A.R. grade |
| copper sulfate | A.R. grade |
| sodium hydrogen carbonate | A.R. grade |
| potassium iodide | A.R. grade |
| potassium oxalate | A.R. grade |
| sodium thiosulfate | A.R. grade |
| starch solution | A.R. grade |
| 3. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์น้ำตาลซูโครส | |
| copper sulfate | A.R. grade |
| potassium sodium tartrate | A.R. grade |
| sodium hydroxide | A.R. grade |
| hydrochloric acid | A.R. grade |
| ethyl alcohol | A.R. grade |
| 4. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ไขมัน | |
| petroleum ether | A.R. grade |
| 5. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์เส้นใย | |
| hydrochloric acid | A.R. grade |
| sodium hydroxide | A.R. grade |
| ethyl alcohol | A.R. grade |
| sulfuric acid | A.R. grade |
| diethyl ether | A.R. grade |
| petroleum ether | A.R. grade |
| 6. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์กรดระเหย | |
| hydrogen peroxide | A.R. grade |

- | | |
|---|------------|
| sodium hydroxide | A.R. grade |
| phenolphthalein | A.R. grade |
| 7. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์กรดทั้งหมด | |
| sodium hydroxide | A.R. grade |
| phenolphthalein | A.R. grade |
| 8. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์กลีเซอรอล | |
| calcium oxide | A.R. grade |
| ethyl alcohol 90% | A.R. grade |
| absolute alcohol | A.R. grade |
| anhydrous ether | A.R. grade |
| 9. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์เอสเทอร์ | |
| sodium hydroxide | A.R. grade |
| ethyl alcohol 50% | A.R. grade |
| 10. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์อะเซทตดดีไฮด์ | |
| sodium bisulfite | A.R. grade |
| iodine | A.R. grade |
| sodium thiosulfate | A.R. grade |
| 11. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์แอนไฮโดรไซยานิน | |
| hydrochloric acid | A.R. grade |
| ethyl alcohol 50% | A.R. grade |

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. potato dextrose agar

Difco

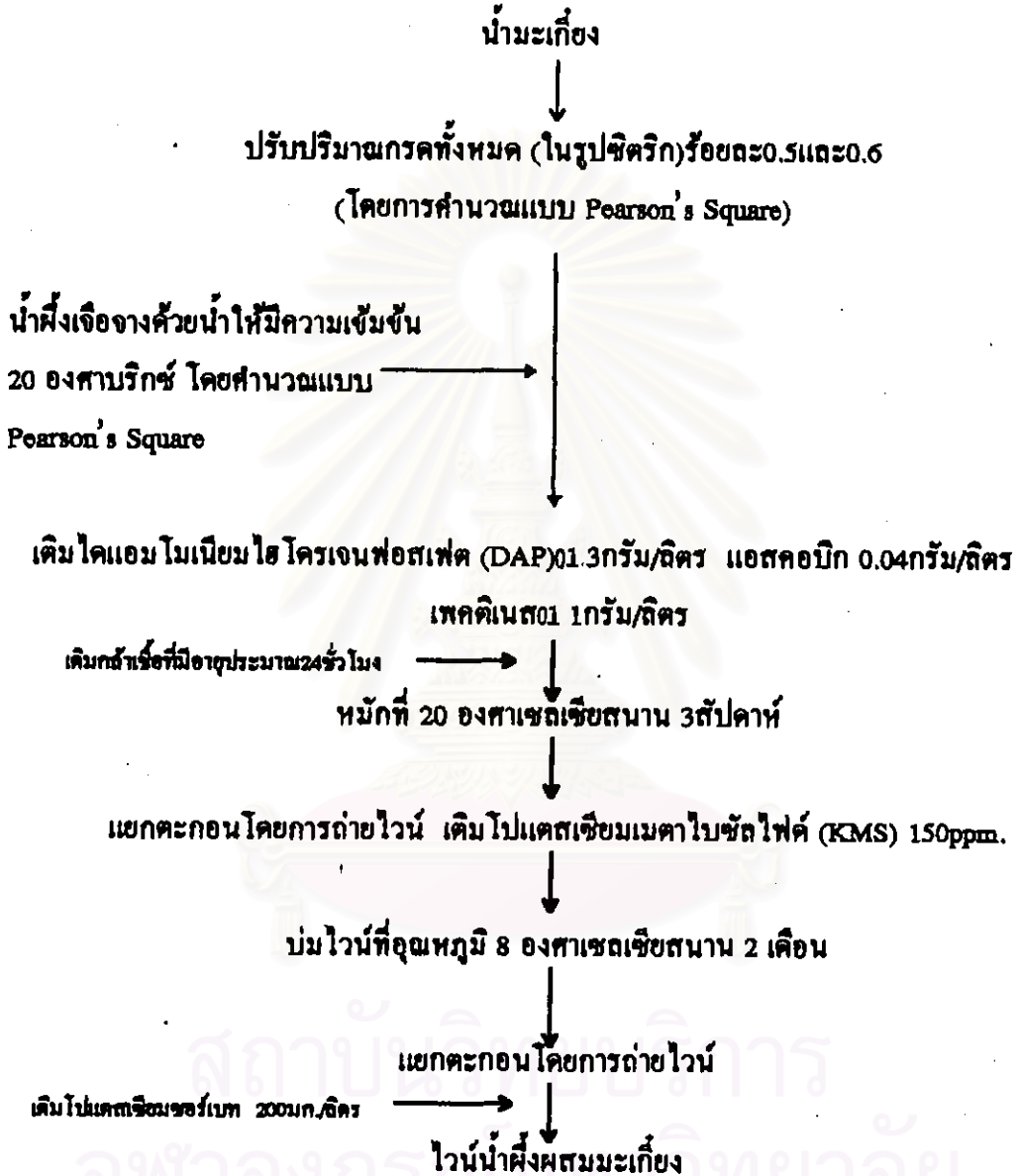
อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมและวิเคราะห์คุณภาพไวน์

1. เครื่องชั่งหยาบ (Sartorius, B3100S)
2. เครื่องชั่งละเอียด (Sartorius, A200S)
3. ไวน์มิเตอร์ (Vinometer)
4. รีแฟลกโตมิเตอร์ (Atago, 2111 - W03)
5. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Rexall, LS - 2)
6. อ่างปรับอุณหภูมิ (Mettler)
7. สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Shimadzu)
8. SEP - PAK C - 18 (Varian)
9. FREEZE DRYER (Eylar,FD- 1)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กระบวนการผลิตไวน์น้ำผึ้งผสมมะเขี๋ยง (ดัดแปลงจาก Morse,1980)

กระบวนการผลิตไวน์น้ำผึ้งผสมมะเขี๋ยงที่ใช้ในงานวิจัยมีแผนผังดังรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 ผังการผลิตไวน์น้ำผึ้งผสมมะเขี๋ยง

การเตรียมน้ำเชื้อ : เตรียมน้ำมะเข็ญให้มีปริมาณกรดทั้งหมด 0.5 และ 0.6% และปรับปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด 20 องศาบริกซ์ โดยใช้น้ำผึ้ง เดิมโคแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (DAP) 0.3 กรัม/ลิตร เพคตินเอส 0.1 กรัม/ลิตร กรดแอสคอร์บิก 0.04 กรัม/ลิตร เดิมเชื้อยีสต์ 1 LOOP ต่อ อาหารสำหรับกล้าเชื้อ 200 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง นำมาใช้

การเตรียมน้ำหมัก : นำผลมะเข็ญแช่แข็งคัมกับน้ำ อัตราส่วน 1:0.5 คัมเค็คนาน 5 นาที บีบคั้นน้ำด้วยเครื่อง Hydraulic press ความดัน 100 บาร์ นาน 2 นาที นำน้ำมะเข็ญที่ได้มาปรับปริมาณกรดด้วยน้ำให้ได้ร้อยละ 0.5 และ 0.6 ปรับปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดให้ได้ 20 องศาบริกซ์ด้วยน้ำผึ้ง เดิมโคแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (DAP) 1.3 กรัม/ลิตร เพคตินเอส 1.3 กรัม/ลิตร และกรดแอสคอร์บิก 0.04 กรัม / ลิตร จากนั้นนำเชื้อยีสต์จากการเตรียมน้ำเชื้อเดิมลงในน้ำหมัก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขั้นตอนและวิธีดำเนินการวิจัย

1. วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต

1.1 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำผึ้งตามเสื่อได้จากฝิ่งเลี้ยง

- ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (total soluble solid) โดยใช้hand refractometer
- ความชื้น (AOAC,1984) วิธีวิเคราะห์ตามภาคผนวก ก.1
- เถ้า (AOAC,1984) วิธีวิเคราะห์ตามภาคผนวก ก.2
- ไนโตรเจน (AOAC,1984) วิธีวิเคราะห์ตามภาคผนวก ก.7
- น้ำตาลอินเวิร์ตทั้งหมด (AOAC,1984) วิธีการวิเคราะห์ตามภาคผนวก ก.14
- ความเป็นกรด (คิดในรูปกรดซิตริก) ไตเตรทกับ 0.1 N NaOH
- พีเอช โดยใช้เครื่อง pH meter
- น้ำตาลรีดิวิซ์ (ในรูปของกลูโคส) (AOAC,1984) วิธีวิเคราะห์ตามภาค

ผนวก.9

- น้ำตาลซูโครส (AOAC,1984) วิธีวิเคราะห์ตามภาคผนวก ก.10

1.2 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของผลมะเกลือ

- ความชื้น (AOAC,1984) วิธีวิเคราะห์ตามภาคผนวก ก.1
- เถ้า (AOAC,1984) วิธีวิเคราะห์ตามภาคผนวก ก.2
- ไขมัน (AOAC,1984) วิธีวิเคราะห์ตามภาคผนวก ก.6
- เส้นใย (AOAC,1984) วิธีวิเคราะห์ตามภาคผนวก ก.8
- โปรตีน (AOAC,1984) วิธีวิเคราะห์ตามภาคผนวก ก.7
- คาร์โบไฮเดรต คำนวณจาก100ลบออกจากค่าความชื้น,เถ้า,ไขมัน,เส้นใย

และโปรตีน

- กรดทั้งหมด (กรดซิตริก) โดยการไตเตรทกับ 0.1 N NaOH (คิดในรูป

กรดซิตริก)

- แอนโธไซยานิน วิธีวิเคราะห์ตามภาคผนวก ก.11

2. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของไวน์

2.1 ปัจจัยที่ใช้ในการศึกษา

- เชื้อยีสต์ โดยใช้เชื้อยีสต์ 3 สายพันธุ์ คือ
Saccharomyces cerevisiae var. *montrachet*
Saccharomyces cerevisiae var. *burgundy*
Saccharomyces cerevisiae var. *bayanus*

- ปริมาณกรดทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษา คือ 0.5% และ 0.6%

2.2 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในน้ำหมัก

- วิเคราะห์ปริมาณกลีเซอรอล (AOAC,1975) วิธีวิเคราะห์ตามภาคผนวกก.3
- วิเคราะห์ปริมาณเอสเทอร์ (AOAC,1984) วิธีวิเคราะห์ตามภาคผนวกก.4
- วิเคราะห์ปริมาณอะเซททิลไฮดรอกซี (AOAC,1984) วิธีวิเคราะห์ตามภาค

ผนวก ก.5

- วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (AOAC,1984) วิธีวิเคราะห์ตามภาคผนวกก.9
- วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลซูโครส (AOAC,1984) วิธีวิเคราะห์ตามภาคผนวก

ก .10,11

- วิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมด (ในรูปกรดซัคทริก) โดยการไตเตรทกับ

0.1N NaOH

- วิเคราะห์แอนโซไซยานิน วิธีวิเคราะห์ตามภาคผนวกก.11
- วัดค่าสี (Hue) (Zoecklein et al.,1990) วิธีวิเคราะห์ตามภาคผนวกก.13

2.3 ติดตามการเปลี่ยนแปลงในระหว่างการหมัก จะทำการวิเคราะห์ทุก 3 วัน

- วิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ ใช้ hand refractometer
- วิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ ใช้ vinometer
- วิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมด(ในรูปกรดซัคทริก) ใช้วิธีไตเตรทกับ 0.1 N

NaOH

- วิเคราะห์ปริมาณกรดระเหย (Rankine,1989) วิธีวิเคราะห์ตามภาคผนวก

ก.12

- วิเคราะห์ปริมาณกรดไม่ระเหย นำค่า ปริมาณกรดทั้งหมด ลบออกจาก

กรดระเหย

2.4 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของไวน์ในช่วงหยุดการหมัก

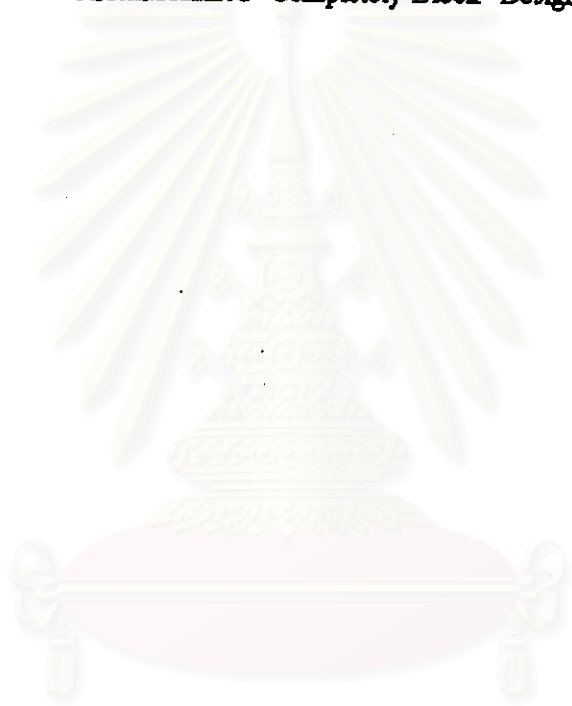
- วิเคราะห์ตามหัวข้อ 2.2 และ 2.3

- วางแผนการทดลองแบบ 2×3 Factorial in Completely Randomized Design (CRD) ทดลอง 2 ซ้ำ

2.5 ติดตามการเปลี่ยนแปลงในระหว่างการบ่มนาน 2 เดือน

- วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีตามหัวข้อ 2.3 ทุก 7 วัน
- วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีตามหัวข้อ 2.2 ทุก 1 เดือน
- ประเมินผลทางประสาทสัมผัส โดยใช้ผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝน 8 คน

โดยวางแผนการทดลองแบบ Randomized Completely Block Design (RCBD) ทดลอง 2 ซ้ำ



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย