

## บทที่ 2

### วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

#### วัสดุ

1. ผลไม้สำหรับหมักไวน์ ประกอบด้วย ลูกหว้า มะเมาะ มะม่วงหิมพานต์และกำขำ (มะหาด)
2. เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ Burgardy จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Broth จากบริษัท HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India
4. เอนไซม์
  - เอนไซม์ LALLYME HC, commercial grad จากบริษัท Lallemand Australia Ltd., Australia. LALLYME HC ประกอบด้วย poly-galacturonase, pectin esterase และ pectin lyase
  - เอนไซม์ Pectinase, AR 2.5 U/mg. จากบริษัท Fluka, Switzerland
5. สารช่วยตกตะกอน
  - Casein, commercial grad
  - Gelatin, commercial grad
  - Bentonite, commercial grad
6. สารเคมี
  - Ammonium dihydrogenphosphate Ajax Finechem, Australia
  - Potassium metabisulphite จากบริษัท Ajax Finechem, Australia
  - Sodium hydrogenphosphate จากบริษัท Ajax Finechem, Australia
  - Potassium sodium tartrate จากบริษัท Ajax Finechem, Australia
  - Sodium hydroxide จากบริษัท Carlo Erba Reagents, France
  - Copper sulfate จากบริษัท Ajax Finechem, Australia
  - Sodium sulfate จากบริษัท Ajax Finechem, Australia
  - Sulfuric acid จากบริษัท Merck, Germany
  - Ammonium molybdate จากบริษัท Ajax Finechem, Australia
  - Sodium asenate จากบริษัท Fluka, Spain
  - Potassium chloride จากบริษัท Analar<sup>®</sup>, England
  - Hydrochloric acid จากบริษัท Lab-Scan Ltd., Ireland
  - Sodium acetate จากบริษัท Ajax Finechem, Australia

## อุปกรณ์

1. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) ยี่ห้อ Orion รุ่น 420A
2. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ยี่ห้อ Memmert รุ่น W350
3. เครื่อง Hand refractometer ยี่ห้อ N.O.W Tokyo, Japan
4. Spectrophotometer ยี่ห้อ Technical Cooperation รุ่น U-2000
5. เครื่องวัดปริมาณแอลกอฮอล์ (ebulliometer) ยี่ห้อ DUJARDIN-SALLERON, France
6. แผ่นสเกลไว้สำหรับอ่านค่าอุณหภูมิ และเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ (DUJARDIN-SALLERON scale) ยี่ห้อ DUJARDIN-SALLERON, France

## วิธีการทดลอง

### 1. ผลการใช้เพคตินเนสในการสกัดน้ำผลไม้ต่อคุณภาพของไวน์

เติมเอนไซม์เพคตินเนสทางการค้า 2 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์ LALLYME HC และเอนไซม์ Pectinase ที่ได้จากเชื้อ *Aspergillus niger* โดยใช้ความเข้มข้น 0, 25 และ 50 พีพีเอ็ม ลงในน้ำลูกหว้า (อัตราส่วนลูกหว้าต่อน้ำเท่ากับ 1:1) นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 30 นาที (Sreenath and Santhanam, 1992) หยุดปฏิกิริยาโดยแช่น้ำเดือดเป็นระยะเวลา 5 นาที ทำการทดลองซ้ำ 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างไปตรวจวิเคราะห์หาองค์ประกอบของน้ำผลไม้ คือ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ความใส ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด และปริมาณสารแอนโทไซยานิน

### 2. ผลของการเติมเอนไซม์เพคตินเนสต่อการหมักไวน์ลูกหว้า

#### 2.1 การเตรียมหัวเชื้อ

การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น โดยใช้เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ Burgardy ที่เลี้ยงในอาหาร Potato Dextrose Broth เขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้เชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นหัวเชื้อเริ่มต้น

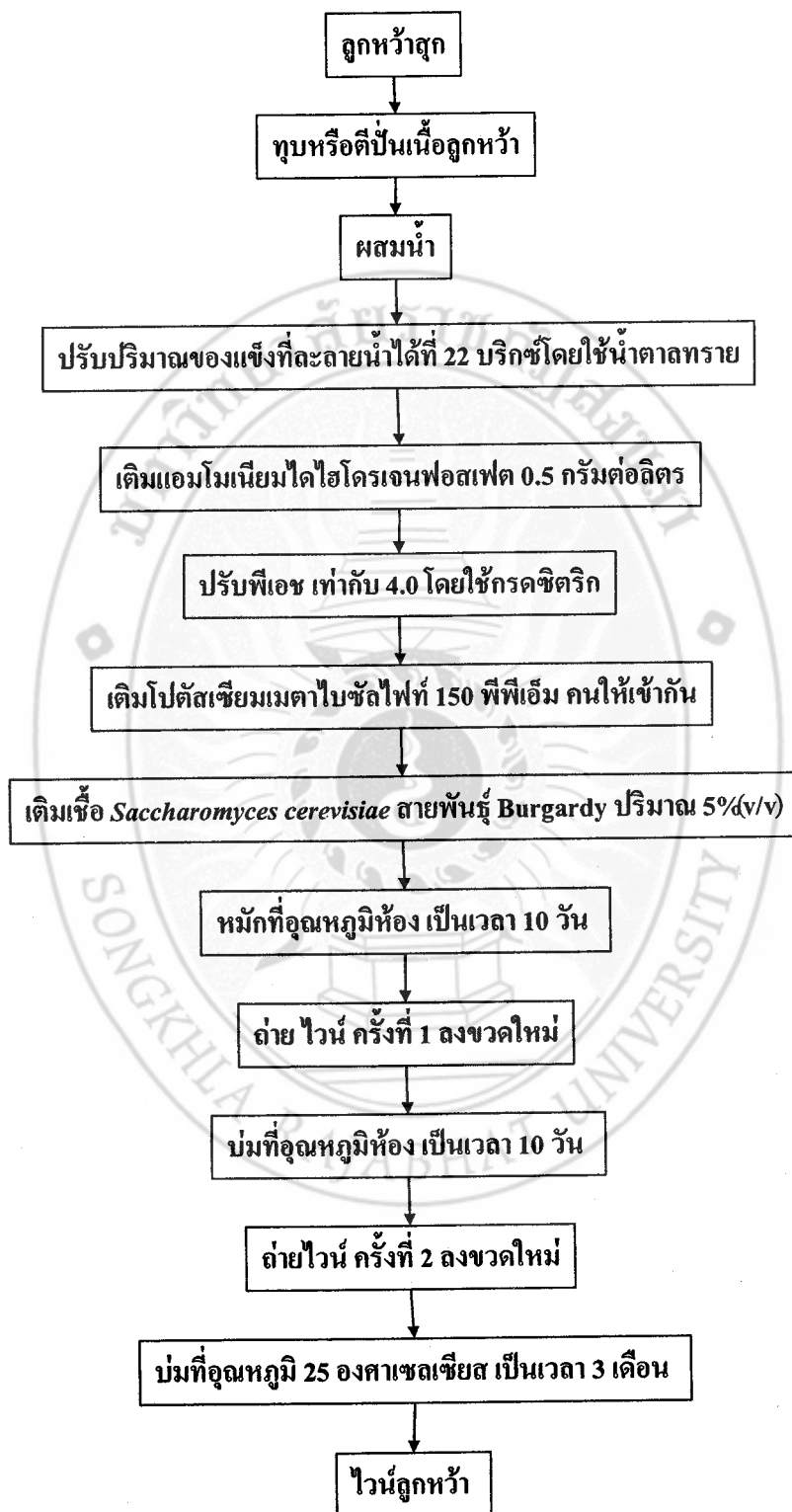
#### 2.2 การเตรียมน้ำลูกหว้า

นำลูกหว้าสุกมาเจือจางกับน้ำในอัตราส่วน 1:1, 1:3, 1:6 และ 1:9 แล้วปรับความเข้มข้นของน้ำตาลให้เป็น 22 บริกซ์ โดยใช้น้ำตาลทราย และปรับพีเอชให้เป็น 4.0 โดยใช้กรดซิตริก หลังจากนั้นเติมแอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อโดยเติมสารโปแตสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ 150 พีพีเอ็ม

#### 2.3 การหมักไวน์

นำหัวเชื้อที่ได้จากข้อ 2.1 มาเติมลงในน้ำลูกหว้าที่ได้จากข้อ 2.2 หลังจากนั้นปล่อยให้เกิดการหมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 10 วัน จากนั้นถ่าย (rack) ไวน์ลงขวดใหม่ แล้วนำไปบ่มต่ออีก 10 วัน ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นถ่ายไวน์ลงขวดใหม่อีกรอบ แล้วนำไวน์ที่ได้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 เดือน (ภาพที่ 1) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของไวน์ โดย

วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณแอลกอฮอล์ พีเอช ความใส ปริมาณกรดทั้งหมด ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด และปริมาณแอนโทไซยานิน



ภาพที่ 1 กระบวนการผลิตไวน์ลูกหว้า

## 2.4 การทดสอบทางประสาทสัมผัส

การทดสอบทางประสาทสัมผัส โดยการชิมไวน์ลูกหว้าที่ผ่านกระบวนการหมักจากข้อ 2.3 โดยใช้ผู้ทดสอบจำนวน 30 คน เพื่อคัดเลือกไวน์ลูกหว้าที่ให้กลิ่นรสที่ดีที่สุด

### 3. ศึกษาคุณสมบัติของไวน์ผลไม้

นำไวน์ผลไม้ 4 ชนิดคือ ไวน์มะเม่า ไวน์ลูกหว้า ไวน์มะม่วงหิมพานต์และไวน์กำขำ (มะหาด) ที่ผ่านการหมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน ทำการ rack ไวน์ลงขวดใหม่ ปล่อยให้หมักต่ออีก 10 วันแล้วทำการ rack ไวน์ลงขวดใหม่อีกครั้ง จากนั้นเก็บตัวอย่างนำไปวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด ความใส พีเอช ปริมาณกรดทั้งหมด และแอลกอฮอล์

4. ศึกษาผลของการใช้เพคตินและสารช่วยตกตะกอนชนิดอื่นต่อความใสและคุณภาพของไวน์ผลไม้

นำไวน์ผลไม้ที่ผ่านการหมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน ทำการ rack ไวน์ลงขวดใหม่ ปล่อยให้หมักต่ออีก 10 วันแล้วทำการ rack ไวน์ลงขวดใหม่อีกครั้ง เตรียมไวน์แต่ละชนิดใส่ขวดทดลองปริมาตร 750 มิลลิลิตรทำการทดลองซ้ำ 3 ซ้ำ จากนั้นนำไวน์ที่ได้มาทำให้ใสโดย

- เติมเอนไซม์เพคตินาส 0, 10, 25 และ 50 พีพีเอ็ม
- เติมเคซีน 0, 50, 100 และ 5000 พีพีเอ็ม
- เติมเจลาติน 0, 10, 50 และ 100 พีพีเอ็ม
- เติมเบนโตไนท์ 0, 100, 300 และ 500 พีพีเอ็ม

### 5. วิเคราะห์ค่าความใสและคุณภาพของไวน์ผลไม้

โดยนำไวน์ผลไม้นำตัวอย่างไวน์มาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ ความเป็นกรด ความใส และปริมาณสารแอนโทไซยานิน ที่เวลา 0, 6, 12, 24, 48, 72 และ 168 ชั่วโมง และวัดแอลกอฮอล์ที่เวลา 0 และ 168 ชั่วโมง

## วิธีการวิเคราะห์

1. การวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Somogyi-Nelson method (Nelson, 1944; Somogyi, 1952)

### สารเคมี

1. โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (disodium hydrogen orthophosphate dodecahydrate;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )
2. โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต (Rochelle salt;  $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )
3. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide;  $\text{NaOH}$ )
4. คอปเปอร์ซัลเฟต (Copper sulfate;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )

5. โซเดียมซัลเฟต (Sodium sulfate;  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )
6. กรดซัลฟูริก (su;furic acid;  $\text{H}_2\text{SO}_4$ )
7. แอมโมเนียมโมลิบเดต (Ammonium molybdate;  $(\text{NH}_4)_6\text{M}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )
8. โซเดียมอาร์ซีเนต (Sodium arsenate;  $\text{Na}_2\text{HAs}_2\text{O}_7\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )

### วิธีการเตรียมสารเคมี

#### 1. การเตรียมสารละลาย Copper reagent

ชั่งสาร โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 71 กรัม และสาร โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เตรต 40 กรัม มาละลายลงในน้ำกลั่นปริมาตร 700 มิลลิลิตร เติม 1 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต 8 กรัม ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมสาร โซเดียมซัลเฟต 180 กรัม ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร เก็บขวดสีชา ตั้งทิ้งไว้ 1-2 วัน ที่อุณหภูมิห้องก่อนนำไปใช้

#### 2. การเตรียมสารละลาย Nelson reagent

ชั่งสารแอมโมเนียมโมลิบเดตมา 50 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 900 มิลลิลิตร เติม กรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาตร 21 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน เติมสาร โซเดียมอาร์ซีเนต 3 กรัม ผสมให้เข้ากัน แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร เก็บในขวดสีชา 1-2 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้

### วิธีการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

#### วิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

- ก. เตรียมสารละลายของน้ำตาลกลูโคสให้มีความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- ข. ปิเปตสารละลายในข้อ ก. มาความเข้มข้นละ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง (blank ใช้ น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร แทน)
- ค. เติมสารละลาย Copper reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
- ง. นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นระยะเวลา 10 นาที แล้วทำให้เย็นทันที
- จ. เติมสารละลาย Nelson reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- ฉ. เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
- ช. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร
- ซ. นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐาน แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ปริมาณน้ำตาล กลูโคส และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

### วิธีการวิเคราะห์ตัวอย่าง

ปีเปตสารละลายตัวอย่างที่เจือจางได้เหมาะสมปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เช่นเดียวกับข้อ 1.1

### 2. การวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมด (total acidity) ตามวิธี AOAC (1990)

#### สารเคมี

1. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide; NaOH)
2. ฟีนอล์ฟทาเลอิน

#### วิธีการวิเคราะห์

1. คุดตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร
2. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 45 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร
3. หยดฟีนอล์ฟทาเลอินลงไป 2-3 หยด
4. นำไปไทเทรตด้วยสารละลาย 0.05 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ จนถึงจุดยุติ (เกิดสีชมพูอ่อน)

#### วิธีการคำนวณ

$$\text{เปอร์เซ็นต์กรด} = \frac{(N)(V)(Mw)(100)}{(5)(1000)}$$

โดยที่

N	=	นอร์มอลของค่าที่ใช้
V	=	ปริมาณค่าที่ใช้ในการไทเทรต (มิลลิลิตร)
5	=	ปริมาตรตัวอย่างที่ใช้ (มิลลิลิตร)
100	=	คิดเป็นร้อยละ
1000	=	การเปลี่ยน mg Equivalent เป็นกรัม Equivalent
Mw	=	น้ำหนักโมเลกุลของกรดอะซิติก (60.05)

### 3. การวิเคราะห์หาปริมาณแอลกอฮอล์โดยใช้เครื่องวัดแอลกอฮอล์ (Ebulliometer) ตามวิธีของ Zoecklein และคณะ (1995)

Ebulliometer เป็นเครื่องมือที่ใช้หาปริมาณแอลกอฮอล์โดยการหาจุดเดือดแล้วเปรียบเทียบกับแผ่นสเกลไว้สำหรับอ่านค่าอุณหภูมิ และเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ (DUJARDIN-SALLERON scale) เครื่องมือประกอบด้วยโลหะทรงกระบอก 2 ส่วน คือ ส่วน A และ B ต่อกัน ทรงกระบอกส่วน A จะเป็นส่วนที่บรรจุสารละลายที่ต้องการหาปริมาณแอลกอฮอล์ โดยบรรจุสารละลายที่ต้องการลงในช่อง C และเสียบเทอร์โมมิเตอร์ปิดไว้ สำหรับอ่านค่าอุณหภูมิ ใส่น้ำสำหรับหล่อเย็นลงในช่อง D จากนั้นสวมต่อทรงกระบอก A และ B ตรงช่อง E ส่วน F เป็นที่ใช้สำหรับเปิดถ่ายสารละลายออก และท่อ G เป็นตำแหน่งสำหรับรวมเปลวไฟจากตะเกียง แสดงในภาพที่ 2

## อุปกรณ์

1. เครื่องวัดปริมาณแอลกอฮอล์ (ebulliometer) ยี่ห้อ DUJARDIN-SALLERON ประเทศฝรั่งเศส
2. แผ่นสเกลไว้สำหรับอ่านค่าอุณหภูมิ และเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ (DUJARDIN-SALLERON scale) (ภาพที่ 3)

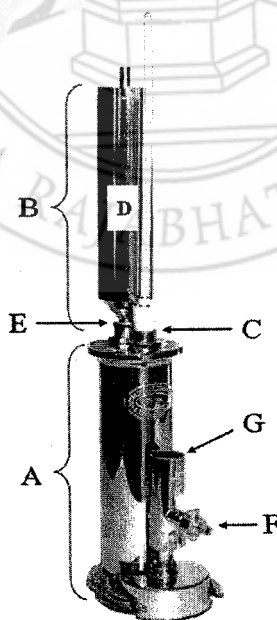
## วิธีการวิเคราะห์

### 1. การหาจุดเดือดของน้ำกลั่น

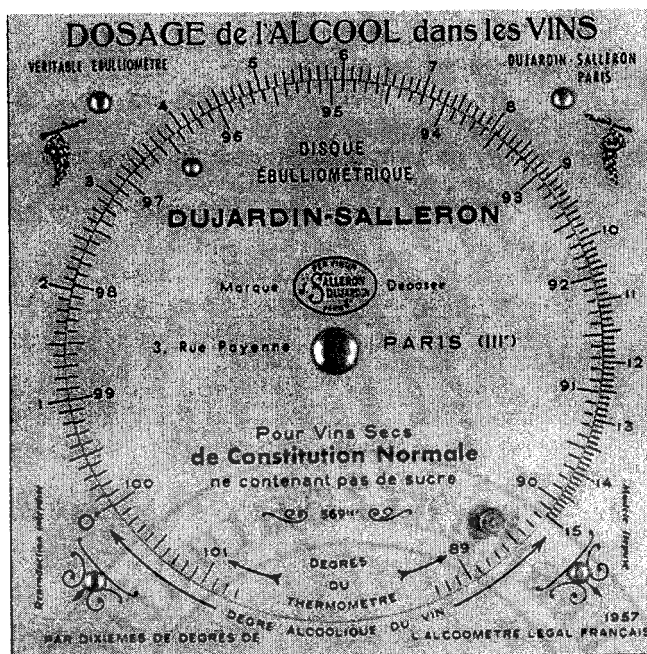
- ก. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 30 มิลลิลิตรลงในช่อง C และเสียบเทอร์โมมิเตอร์ปิดไว้
- ข. เติมน้ำล่อเย็นในช่อง D จากนั้นสวมต่อทรงกระบอก A และ B ตรงช่อง E
- ค. จุดตะเกียงแล้ววางไว้ใต้ท่อ G
- ง. เมื่อน้ำเดือดแล้วอ่านอุณหภูมิที่คงที่ (คงที่ประมาณ 15-30 วินาที)
- จ. นำค่าของอุณหภูมิที่ได้ไปปรับสเกล โดยให้จุดศูนย์กลางของสเกลวงนอกตรงกับค่าอุณหภูมิจุดเดือดของน้ำกลั่น

### 2. การหาจุดเดือดของตัวอย่าง

เติมสารละลายตัวอย่างปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในช่อง C และเสียบเทอร์โมมิเตอร์ จากนั้นนำไปวิเคราะห์เช่นเดียวข้อ 4.1 ตั้งแต่ข้อ ข. ถึง ง. การอ่านค่าปริมาณแอลกอฮอล์ ให้อ่านค่าปริมาณแอลกอฮอล์จากแผ่นสเกลวงนอกที่ตรงกับค่าอุณหภูมิจุดเดือดของสารละลายตัวอย่างที่ได้ หน่วยของปริมาณแอลกอฮอล์ที่ได้คือ เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรต่อปริมาตร (% v/v)



ภาพที่ 2 เครื่องวัดปริมาณแอลกอฮอล์



ภาพที่ 3 แผ่นสเกลสำหรับอ่านค่าอุณหภูมิ และเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์

#### 4. การหาปริมาณแอนโซไซยานิน (Fuleki และ Francis, 1968)

##### สารเคมี

2. โพแทสเซียมคลอไรด์ (Potassium chloride; KCl)
3. กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid; HCl)
4. โซเดียมอะซิเตต (Sodium acetate)

##### วิธีการเตรียมสารเคมี

##### 1. สารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 1

ผสมสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ 0.2 นอร์มอล ปริมาตร 125 มิลลิลิตร กับสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.2 นอร์มอล ปริมาตร 385 มิลลิลิตร แล้วปรับให้ได้พีเอช 1.0 แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

##### 2. สารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 4.5

ผสมสารละลายโซเดียมอะซิเตต 1 นอร์มอล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร กับสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 1 นอร์มอล ปริมาตร 240 มิลลิลิตร แล้วปรับให้ได้พีเอช 4.5 แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

##### วิธีการวิเคราะห์

1. ผสมสารละลายตัวอย่าง กับสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 1 อัตราส่วน 1:10
2. ผสมสารละลายตัวอย่าง กับสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 4.5 อัตราส่วน 1:10





- นำสารละลายจากข้อ 1 และ 2 ตั้งทิ้งไว้ในที่มีดที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง
- นำสารละลายที่ปรับด้วยสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 1.0 และพีเอช 4.5 ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร และ 700 นาโนเมตร (blank ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายตัวอย่าง)

**วิธีการคำนวณ**

$$\text{ปริมาณแอนโทไซยานิน} = \frac{(A_1 - A_2)(DF)(Mw)(1000)}{(E)(I)}$$

- โดยที่
- $A_1$  = OD<sub>515</sub>-OD<sub>700</sub> ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 1.0
  - $A_2$  = OD<sub>515</sub>-OD<sub>700</sub> ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 4.5
  - DF = dilution factor
  - E = ค่าโมลาร์ Absorbance ของ Cyanidin-3-glucoside เท่ากับ 26900
  - I = 1.0
  - Mw = น้ำหนักโมเลกุลของของ Cyanidin-3-glucoside เท่ากับ 449.2

**5. การวัดค่าพีเอช**

วัดค่าพีเอช โดยใช้เครื่อง pH meter ยี่ห้อ Orion รุ่น 420A

**6. การหาปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด**

วัดค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด โดยใช้เครื่อง Hand refractometer

**7. การวิเคราะห์ความใส (%T; %Transmittance)**

วัดค่าความใสหรือ %Transmittance โดยใช้เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer)

ยี่ห้อ Technical Corporation รุ่น U-2000 ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank

**8. การวิเคราะห์ทางสถิติ**

ในแต่ละขั้นตอนของการศึกษามีการวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) โดยกำหนดให้จำนวนซ้ำ (replication) ในการศึกษาแต่ละครั้งเท่ากับ 3 ซ้ำ และวิเคราะห์ค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS (Statistic Package for the Social Science) Version 14.0

๙  
๖๖๓.๒  
๔ 4๖๓