บทที่ 2
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุ

1. ผลไม้สำหรับหมักไวน์ ประกอบด้วย ลูกหว้า มะเม่า มะม่วงหิมพานต์และกำชำ (มะหวด)
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, pactin esterase และ pactin 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 molydate จากบริษัท Ajax Finechem, Australia
    - Sodium asenate จากบริษัท Fluka, Spain
    - Potassium chloride จากบริษัท Analar®, 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, Janpan
4. Spectrophotometer ยี่ห้อ Technical Coorperation รุ่น U-2000
5. เครื่องวัดปริมาณแอลกอฮอล์ (ebulliometer) ยี่ห้อ DUJARDIN-SALLERON, France
6. แผ่นสเกลไว้สำหรับอ่านค่าอุณหภูมิ และเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ (DUJARDIN-SALLERON scale) ยี่ห้อ DUJARDIN-SALLERON, France

วิธีการทดลอง

1. ผลการใช้เพคติเนสในการสกัดน้ำผลไม้ต่อคุณภาพของไวน์

เติมเอนไซม์เพคติเนสทางการค้า 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 และปริมาณสารแอนโธไซยานิน

2. ผลของการเติมเอนไซม์เพคติเนสต่อการหมักไวน์ลูกหว้า

2.1 การเตรียมหัวเชื้อ

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

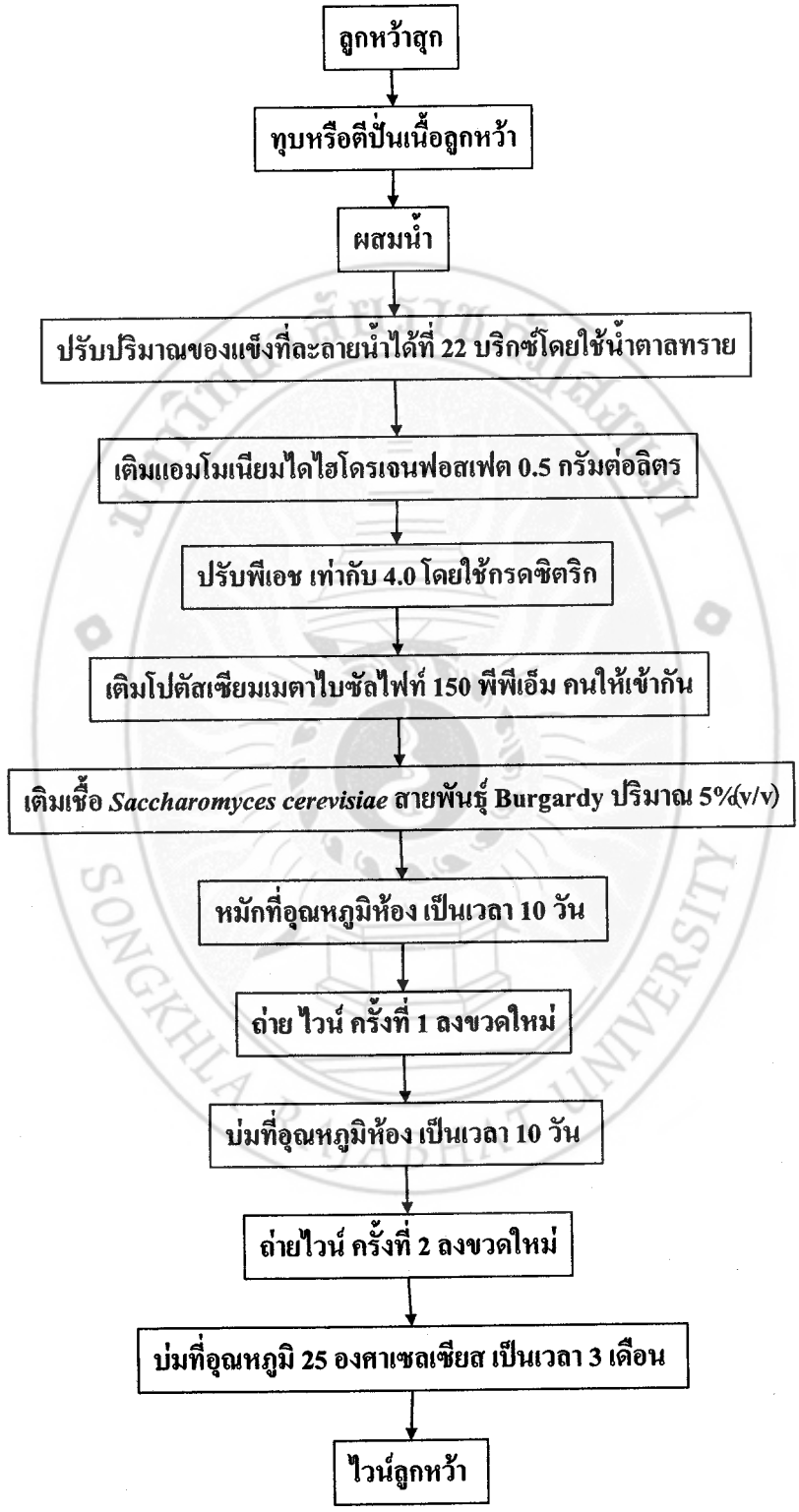
2.2 การเตรียมน้ำลูกหว้า

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 และปริมาณแอนโธไซยานิน



ภาพที่ 1 กระบวนการผลิตไวน์ลูกหว้า

2.4 การทดสอบทางประสาทสัมผัส

การทดสอบทางประสาทสัมผัส โดยการชิมไวน์ลูกหว้าที่ผ่านกระบวนการหมักจากข้อ 2.3 โดยใช้ผู้ทดสอบจำนวน 30 คน เพื่อคัดเลือกไวน์ลูกหว้าที่ให้กลิ่นรสที่ดีที่สุด

3. ศึกษาคุณสมบัติของไวน์ผลไม้

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

4. ศึกษาผลของการใช้เพคติเนสและสารช่วยตกตะกอนชนิดอื่นต่อความใสและคุณภาพของไวน์ผลไม้

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

- เติมเอนไซม์เพคติเนส 0, 10, 25 และ 50 พีพีเอ็ม
- เติมเคซีน 0, 50, 100 และ 5000 พีพีเอ็ม
- เติมเจลลาติน 0, 10, 50 และ 100 พีพีเอ็ม
- เติมเบนโตไนท์ 0, 100, 300 และ 500 พีพีเอ็ม

5. วิเคราะห์ค่าความใสและคุณภาพของไวน์ผลไม้

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

วิธีการวิเคราะห์

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

สารเคมี

1. โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (disodium hydrogen orthophosphate dodecahydrate; $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$)
2. โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต (Rochelle salt; $KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$)
3. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide; NaOH)
4. คอปเปอร์ซัลเฟต (Copper sulfate; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$)

5. โซเดียมซัลเฟต (Sodium sulfate; Na_2SO_4)
6. กรดซัลฟูริก (su;furic acid; H_2SO_4)
7. แอมโมเนียมโมลิบเดต (Ammonium molybdate; $(NH_4)_6M_7O_{24}\cdot 4H_2O$)
8. โซเดียมอาร์ซีเนต (Sodium asenate; $Na_2HAs_2O_7\cdot 7H_2O$)

วิธีการเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมสารละลาย Copper reagent

ชั่งสารโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 71 กรัม และสารโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต 40 กรัม มาละลายลงในน้ำกลั่นปริมาตร 700 มิลลิลิตร เติม 1 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต 8 กรัม ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมสารโซเดียมซัลเฟต 180 กรัม ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร เก็บขวดสีชา ตั้งทิ้งไว้ 1-2 วัน ที่อุณหภูมิห้องก่อนนำไปใช้

2. การเตรียมสารละลาย Nelson reagent

ชั่งสารแอมโมเนียโมลิบเดตมา 50 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 900 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาตร 21 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน เติมสารโซเดียมอาร์ซีเนต 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 ใช้น้ำกลั่น 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 ที่อุณภูมิห้อง

ฉ. เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

ช. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

ซ. นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐาน แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ปริมาณน้ำตาลกลูโคส และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

วิธีการวิเคราะห์ตัวอย่าง

ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่เจือจางได้เหมาะสมปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เช่นเดียวกับข้อ 1.1

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

สารเคมี

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

วิธีการวิเคราะห์

1. ดูดตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร
2. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 45 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร
3. หยดฟีนอฟทาลีนลงไป 2-3 หยด
4. นำไปไทเทรตด้วยสารละลาย 0.05 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ จนถึงจุดยุติ (เกิดสีชมพูอ่อน

วิธีการคำนวณ

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

โดยที่ N = นอร์มอลของด่างที่ใช้

V = ปริมาณด่างที่ใช้ในการไทเทรต (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 ใส่น้ำสำหรับล่อเย็นลงในช่อง D จากนั้นสวมต่อทรงกระบอก A และ B ตรงช่อง E ส่วน F เป็นที่ใช้สำหรับเปิดถ่ายสารละลายออก และท่อ G เป็นตำแหน่งสำหรับรวมเปลวไฟจากตะเกียง แสดงในภาพที่ 2

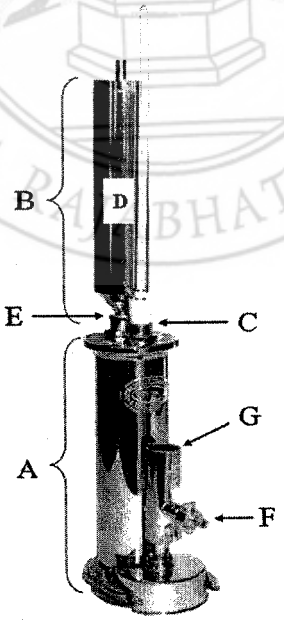
อุปกรณ์

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

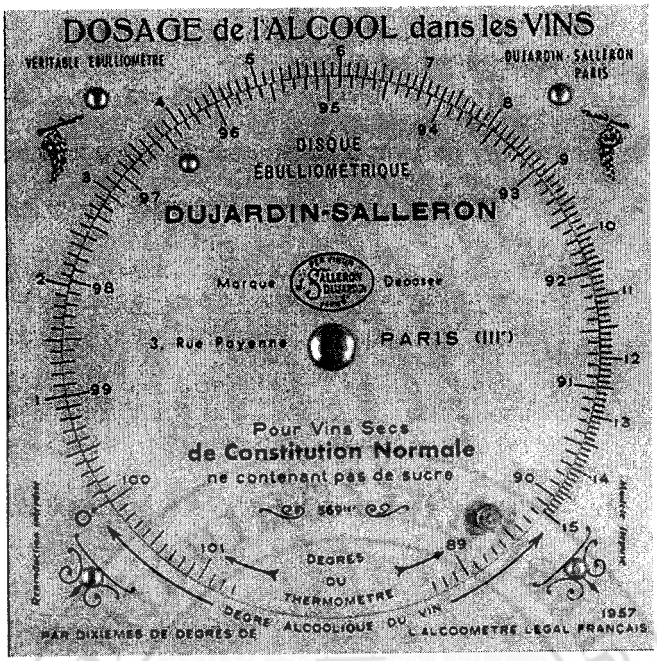
วิธีการวิเคราะห์

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 โดยให้ขีดศูนย์ของสเกลวงนอกตรงกับค่าอุณหภูมิจุดเดือดของน้ำกลั่น
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. การหาปริมาณแอนโธไซยานิน (Fuleki และFrancis, 1968)

สารเคมี

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

วิธีการเตรียมสารเคมี

1. สารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 1

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

2. สารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 4.5

ผสมสารละลายโซเดียมอะซีเตต 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

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ
มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

3. นำสารละลายจากข้อ 1 และ 2 ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลานาน 2 ชั่วโมง
4. นำสารละลายที่ปรับด้วยสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 1.0 และพีเอช 4.5 ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร และ 700 นาโนเมตร (blank ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายตัวอย่าง)

วิธีการคำนวณ

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

โดยที่ A_1 = OD_{515}-OD_{700} ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 1.0

A_2 = OD_{515}-OD_{700} 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

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

ว
663.2
ส 467
158092
- 4 ส.ค. 25