บทที่ 3

อุปกรณ์ สารเคมีและวิธีการทดลอง

วัตถุดิบ อุปกรณ์และสารเคมี

3.1 วัตถุดิบ

- ดอกกระเจี๊ยบแดงแห้ง
- สับปะรด
- น้ำตาลทรายขาว

3.2 เชื้อจุลินทรีย์

- เชื้อยีสต์ (active dry yeast) : *Saccharomyces cerevisiae* var. *bayanus*

3.3 อุปกรณ์

3.3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำไวน์สับปะรดและไวน์กระเจี๊ยบแดง

- ถังพลาสติก (PE) แบบเคลือบด้านใน สำหรับใช้หมักไวน์ ขนาด 500 ลิตร
- ถังพลาสติก (PE) ขาวขุ่น ขนาด 20 ลิตร สำหรับบ่มไวน์
- ห้องเย็นที่ควบคุมอุณหภูมิระหว่างการบ่มไวน์ (อุณหภูมิ10-12 องศาเซลเซียส)
- เครื่องปั่นผลไม้ ขนาดจุ 12 ลิตร
- ระบบปั๊มดูดเพื่อถ่ายส่วนใสของไวน์

3.3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพ

3.3.2.1 อุปกรณ์ที่ใช้วิเคราะห์คุณภาพทางเคมี

-เครื่องวิเคราะห์หาแอลกอฮอล์ (Ebulliometer)

-เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้(Hand Refractometer, ATAGO)

- pH meter (Hanna, Model Hi 9321, Potugal)
- ชุดกลั่นวิเคราะห์ SO_2
- ชุดกลั่นวิเคราะห์ volatile acid
- ชุดไตเตรทหาปริมาณกรด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.2.2 อุปกรณ์ที่ใช้วิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ

- เครื่องวัดสี (Hunter Lab, Color Quest II ,USA
- เครื่องมือวัดความขุ่น (HACH : Model 2100 A Germany)
- เครื่อง UV / Visible recording spectrophotometer, JASCO V-530, Japan.

3.3.2.3 อุปกรณ์วิเคราะห์ทางจุลินทรีย์

- จานเพาะเชื้อ (petri dish)
- เครื่องฆ่าเชื้อ (autoclave; Hirayama Model HA-300MIV, Japan)
- ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Gallem-kamp, England)

3.3.2.4 อุปกรณ์การกรองไวน์ด้วยเยื่อแผ่นสังเคราะห์

- ชุดกรองไวน์ (Sartorius: Model Sartocon Slice Cassettes, Germany)

3.4 สารเคมี

- กรดซัลฟูริค (Sulfuric acid ; H_2SO_4, Merck, Germany)
- กรดไฮโดรคลอริค (Hydrochloric acid ; HCl, Merck, Germany)
- คอปเปอร์ซัลเฟต (Copper sulfate ; $CuSO_4.5H_2O$, Germany)
- Peptone (Bacto® Peptone, Difco Laboratory, USA)
- Plate Count Agar (Bacto® Plate Count Agar, Difco Laboratory, USA)
- Potato Dextrose Agar (Bacto® Plate Count Agar., Difco Laboratory, USA)
- Methyl red indicator
- Ethyl alcohol
- Phenolphthalein indicator
- Potassium hydrogen phathalate (Merck, Germany)
- Sodium potassium tartrate (Merck, Germany)
- Sodium thiosulphate ($Na_2S_2O_3.5H_2O$, Merck, Germany)
- Potassium metabisulphite (KMS)
- Citric acid
- Trataric acid
- Diammonium phosphate

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

- Bentonite
- Polyvinyl-Polypyrrolidone (PVPP)
- Pectinase enzyme

3.5 ประมวลผลข้อมูล ด้วย โปรแกรมประมวลผลข้อมูลสำเร็จรูป SPSS V. 10.0

3.6 วิธีการดำเนินงานวิจัย ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ

3.6.1 การศึกษาหาปริมาณเอ็นไซม์เพคติเนสที่เหมาะสม ในการวิจัยนี้ใช้ผลไม้ 2 ชนิด เป็นวัตถุดิบในการทำไวน์ผลไม้ คือ สับปะรด และกระเจี๊ยบแดงแห้ง ซึ่งมีขั้นตอนดำเนินการดังนี้

1. การเตรียมน้ำหมัก ในไวน์กระเจี๊ยบแดง ใช้กระเจี๊ยบแดงแห้ง 30 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตรต้มให้เดือดเพื่อสกัดสีแล้วปล่อยให้เย็น ส่วนในไวน์สับปะรด ใช้สับปะรดปอกเปลือก สับละเอียดและคั้นน้ำ ผสมน้ำสับปะรดกับน้ำในอัตราส่วน 1 ต่อ 3 แยกเตรียมตามชนิดผลไม้ มีการปรับปริมาณกรดของน้ำผลไม้ทั้งสองชนิดโดยการเติมน้ำสำหรับน้ำกระเจี๊ยบ และเติมกรดซิตริคสำหรับน้ำสับปะรดให้มีปริมาณกรดร้อยละ 0.5 คิดเป็นกรดซิตริก หลังจากนั้นเติมน้ำตาลเพื่อปรับให้มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเป็น 20 องศาบริกซ์ แบ่งน้ำผลไม้ส่วนหนึ่งไปทำหัวเชื้อตามขั้นตอนที่ 2 หลังจากนั้นเติมไดแอมโมเนียมฟอสเฟต 0.2 กรัมต่อลิตร เพื่อเป็นอาหารเสริมให้ยีสต์ และโปตัสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ ($K_2S_2O_5$) 150 พีพีเอ็ม เพื่อฆ่าเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ ที่ปนเปื้อนมาบรรจุน้ำผลไม้ลงในขวดพลาสติกใส (PET) ขวดละ 5 ลิตร

2. การเตรียมหัวเชื้อ แบ่งน้ำผลไม้ที่เตรียมได้ทำหัวเชื้อ (starter) โดยการฆ่าเชื้อน้ำผลไม้ที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ปล่อยให้เย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 35 องศาเซลเซียส เติมยีสต์ผง (active dried yeast) สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* var. *bayanus* ปริมาณ 0.003 กรัมต่อน้ำผลไม้ 500 มิลลิลิตร (ละลายยีสต์ในน้ำอุ่นอุณหภูมิ 35 - 40 องศาเซลเซียส จำนวน 100 มิลลิลิตร และตั้งทิ้งไว้ 20-30 นาทีก่อนเติม) ตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง หรือจนเชื้อยีสต์มีการเจริญเต็มที่ โดยดูจากการมีฟองแก๊สมากพอควร

3. การเติมเอ็นไซม์เพคติเนส เติมเอ็นไซม์เพคติเนสลงในน้ำผลไม้ที่บรรจุขวดในปริมาณแตกต่างกัน 3 ระดับ คือ ร้อยละ 0.001, 0.002 และ 0.003 (โดยน้ำหนัก) เปรียบเทียบกับการไม่ใช้ ปิดขวดด้วยจุกสำลีตั้งทิ้งไว้ 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

4. การหมักไวน์ เติมหัวเชื้อปริมาณร้อยละ 10 ของน้ำผลไม้ ลงในน้ำผลไม้ที่เติมเอ็นไซม์เพคติเนสครบ 12 ชั่วโมง แล้ว ทำการหมักที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสนาน 1-2 สัปดาห์ เมื่อครบเวลาแยกกากออกแล้วหมักต่อจนการหมักสิ้นสุด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

5. ถ่ายแยกส่วนใส บ่มไวน์ไว้ 1 สัปดาห์ ถ่ายแยกส่วนใสอีกครั้งหนึ่ง นำไวน์มาวัดค่าความขุ่น สี (L*, a*, b*) และค่า light transmission เลือกไวน์แต่ละชนิดที่ให้ค่าความขุ่นน้อยที่สุดมาทดลองหาชนิดและปริมาณสารช่วยตกตะกอนที่เหมาะสมต่อไป

3.6.2 การศึกษาชนิดและปริมาณสารช่วยตกตะกอนที่เหมาะสมในการตกตะกอนไวน์กระเจี๊ยบแดงและไวน์สับปะรด

นำไวน์ที่ให้ค่าความขุ่นน้อยที่สุดจากการทดลองในข้อ 3.6.1 มาทดลองหาชนิดและปริมาณสาร ช่วยตกตะกอนที่เหมาะสมดังนี้

1. หาความเป็นไปได้ของสารช่วยตกตะกอน 2 ชนิด คือ เบนโทไนท์ และ Polyvinyl-polypyrrolidone (PVPP) โดยใช้สารทั้งสองชนิดที่ระดับ 0.05, 0.10 และ 0.15 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตรในไวน์แต่ละชนิด ผสมให้เข้ากันแล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน เมื่อครบเวลานำส่วนใสของไวน์มาตรวจวัดค่าความขุ่น เปรียบเทียบกัน เพื่อหาชนิดและระดับของสารช่วยตกตะกอนที่เหมาะสม

2. เลือกใช้สารช่วยตกตะกอนที่เหมาะสม สำหรับไวน์แต่ละชนิดนำมาศึกษาปริมาณที่เหมาะสม โดยใช้ปริมาณสาร 3 ระดับ ทำการตกตะกอนตามข้อ 1 จากนั้นนำไวน์ที่ได้มาวัดค่าความขุ่น ค่า light transmission และ (L*, a*, b*) วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวนถ้าพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ทำการทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS V. 10.0

3.6.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการกรองด้วยเครื่องกรองแบบเยื่อแผ่นสังเคราะห์ มีขั้นตอนดังนี้

1. ทำการหมักไวน์ตามวิธีการในข้อ 3.2.1 โดยใช้ปริมาณเอ็นไซม์และสารช่วยตกตะกอนที่เหมาะสมจากการทดลองในข้อ 3.2.1 และ 3.2.2 ทำการบ่มไวน์เป็นเวลา 1 เดือน

2. กรองไวน์เบื้องต้นด้วยเครื่องกรองแบบ filter press ใช้แผ่นกรองที่มีขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน

3. กรองไวน์ด้วยเครื่องกรองแบบเยื่อแผ่นสังเคราะห์ ขนาดรูพรุน 0.2 ไมครอน โดยใช้ความดันคร่อมเยื่อแผ่น(Pt) 0.25, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 บาร์สำหรับไวน์สับปะรด และความดันคร่อมเยื่อแผ่น(Pt) 0.3, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 บาร์สำหรับไวน์กระเจี๊ยบแดง เปรียบเทียบค่าฟลักซ์ที่กรองได้ในแต่ละความดัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

4. เลือกความดันที่เหมาะสมจากข้อ 3 ทำการกรองไวน์ทั้งสองชนิดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยทำ 2 ครั้ง และเก็บตัวอย่างทุกๆ 15 นาที

3.6.4 การตรวจสอบคุณภาพไวน์ก่อนและหลังการกรอง

1. การตรวจสอบคุณภาพทางเคมี

- ปริมาณกรดทั้งหมด (total acidity) (Iland, 1993)
- ปริมาณกรดที่ระเหยได้ (volatile acidity) (Iland, 1993)
- ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (total soluble solid) โดยใช้ Hand Refracto meter (Iland, 1993)
- ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิง(reducing sugar)โดยวิธี Rebelin method (Iland, 1993)
- ปริมาณแอลกอฮอล์ โดยวิธี Ebulliometry (Iland, 1993)
- ปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ โดยวิธี Aspiration method (AOAC, 1998)

2. การตรวจสอบคุณภาพทางกายภาพ

- การวัดความขุ่น (turbidity) ด้วยเครื่อง Turbidimeter (HACH รุ่น 2100 A),
- การวัดค่า light transmission ด้วยเครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์ (JASCOV-530), ตามวิธีการของ Richard (1981) สำหรับไวน์สับปะรดวัดที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร และไวน์กระเจี๊ยบแดงที่ความยาวคลื่น 525 นาโนเมตร
- การวัดสี (L*, a*, b*) โดยใช้เครื่องวัดสี Hunter Lab

3. การตรวจสอบคุณภาพทางจุลชีววิทยา

- หาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (total plate count) ตามวิธี AOAC (1998)
- หาปริมาณยีสต์และรา (yeast and mold) ตามวิธี AOAC (1998)
- เก็บไวน์ที่ผ่านการกรองด้วยเครื่องกรองแบบ filter press และเครื่องกรองแบบเยื่อแผ่นสังเคราะห์ โดยบรรจุขวดเติมสารกันเสียโซเดียมเบนโซเอท 100 พีพีเอ็ม ปิดฝาสนิท เก็บที่อุณหภูมิห้อง 30±2 องศาเซลเซียส นาน 1 เดือน ตรวจหาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดและปริมาณยีสต์และรา

4.การตรวจคุณภาพทางประสาทสัมผัส

ให้ผู้ทดสอบชิมไวน์ที่ไม่ได้กรองกับไวน์ที่กรองผ่าน filter press และตัวอย่างไวน์ที่กรองด้วย filter press กับไวน์ที่กรองผ่านเยื่อแผ่นสังเคราะห์ โดยใช้แผนการชิมแบบ triangle test

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved