

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

3.1 วัสดุ

3.1.1 วัตถุดิบ

1. เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ซึ่งเป็นเชื้อยีสต์ผง (active dry yeast) ที่มีจำหน่ายทางการค้าจำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่

- สายพันธุ์ Lalvin EC-1118 (Lallemand Inc., Motreal, Canada)
- สายพันธุ์ Lalvin K1V-1116 (Lallemand Inc., Motreal, Canada)
- สายพันธุ์ Fermivin (7013) (DSM Food speclaltics Oenology, France)
- สายพันธุ์ Fermivin PDM (9068) (DSM Food speclaltics Oenology, France)

2. ผลหม่อนจำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์เชียงใหม่ และสายพันธุ์บุรีรัมย์ 60 จากศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติ ฯ เชียงใหม่ โดยแยกเก็บรักษาไว้ตามระยะความสุก คือ สีดำ - แดง กับสีน้ำตาล ซึ่งนำไปแช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ - 18 องศาเซลเซียส

3. น้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ห่อมิตรผล

3.1.2 สารเคมี

1. Acetic acid (Fisher, England)
2. Ammonium molybdate (Fisher, England)
3. Acetone (Merck, Germany)
4. Citric acid (Carlo, Italy)
5. Copper sulfate pentahydrate (Merck, Germany)
7. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (Sigma, USA)
8. Ethanol (Merck, Germany)
9. Ethylenediamine tetra acetic acid (BDH, England)
10. Hydrogen peroxide (Merck, Germany)
11. Hydrochloric acid (Merck, Germany)
12. L-Ascorbic acid (Carlo, Italy)
13. Metaphosphoric acid (Merck, Germany)

14. Methanol (Merck, Germany)
15. Orthophosphoric acid (Merck, Germany)
16. Oxalic acid (Fisher, England)
17. Potassium metabisulfide (Food grade)
18. Potassium chloride (Merck, Germany)
19. Potassium iodide (Ajex, Australia)
20. Phenolphthalein (May & Baker, England)
21. Petroleum ether (Merck, Germany)
22. Sodium thiosulphate (Ajex, Australia)
23. Sodium acetate (Carlo, Italy)
24. Sodium potassium tartrate (Merck, Germany)
25. Sodium hydroxide (Merck, Germany)

3.2 อุปกรณ์

3.2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ผลิตไวน์หมอน

1. เครื่องแยกกาก (Pulper finisher)
2. เครื่องซังไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Cubota รุ่น KF-Z-6, Japan
3. ถังพลาสติก (Polyethylene theraphtharate, PET) ขนาด 5 ลิตร
4. ถังผสมสเตนเลส ขนาด 20 ลิตร

3.2.2 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์คุณภาพไวน์หมอน

1. เครื่องซังไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ AND รุ่น HR - 200, Japan
2. เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (Hand refractometer) ยี่ห้อ ATAGO รุ่น model N1 (0 - 32 °Brix), Japan
3. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH) ยี่ห้อ Cyberscan รุ่น 510, Singapore
4. เตาให้ความร้อน (Sterring hotplate) ยี่ห้อ Favorit, Malaysia
5. เครื่องวัดสี (Colorimeter) ยี่ห้อ Minota รุ่น CR - 300, Japan
6. เครื่องวัดแอลกอฮอล์ (Ebulliometer) ยี่ห้อ Dujardin-Salleron, Paris
7. ตู้อบ (Hot air oven) ยี่ห้อ Memmert, Germany
8. ไมโครปิเปต (Micropipette) ยี่ห้อ Biohit PLC, Finland
9. เครื่องปั่นอาหาร (Blender) ยี่ห้อ Waring, USA

10. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ยี่ห้อ Perkin Elmer, รุ่น
lambda 12, Germany

3.3 วิธีการวิจัย

1. ตรวจสอบคุณภาพของผลหมอนสุก

ใช้ผลหมอน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์เชียงใหม่ และสายพันธุ์บุรีรัมย์ 60 ที่เก็บเกี่ยวผลในระยะเวลาสุก 2 ระยะ คือ ที่ผลมีสีดำ - แดง และสีดำล้วน จากนั้นนำไปล้างน้ำสะอาด เก็บใส่ถุงแยกตามสายพันธุ์ และระยะเวลาสุก ที่ตู้แช่เยือกแข็งอุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส เมื่อทำการทดลองจึงแบ่งมาใช้สำหรับศึกษาคุณภาพต่าง ๆ ดังนี้

1. คุณภาพทางกายภาพ ได้แก่
 - ค่าสี ระบบ $L^*a^*b^*$ วัดด้วยเครื่อง Colormeter
2. คุณภาพทางเคมี
 - การวิเคราะห์หองค์ประกอบทางเคมีพื้นฐาน (Proximate analysis) ได้แก่ ความชื้น ไขมัน โปรตีน เถ้า เส้นใย และคาร์โบไฮเดรต ตามวิธีของ AOAC (2000)
3. ความเป็นกรด - ด่าง (pH) ตรวจวัดโดยเครื่อง pH meter
4. ปริมาณกรดทั้งหมด (total acidity) โดยวิธีการไตเตรต ตามวิธี AOAC (2000)
5. ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (total soluble solid, TSS) โดยใช้เครื่อง Hand refractometer
6. น้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีของ Iland *et al.* (1993)
7. ปริมาณวิตามินซี (ในรูปกรดแอสคอร์บิก) โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวระยะคลื่น 760 นาโนเมตร โดยตัดแปลงตามวิธีของ Bajaj and Kaur (1981)
8. ค่า Inhibition โดยใช้สาร 1, 1 - Diphenyl - 2 - picrylhydrazyl (DPPH) ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร และคำนวณในรูปของร้อยละ (สันติ และวรวรรณ, 2544)
9. หาปริมาณสารแอนโทไซยานินโดยใช้เครื่อง Spectrophotometer คัดแปลงตามวิธีของ Fuleki *et al.* (1968)

วางแผนการทดลองแบบ 2 x 2 Factorial in Completely Randomized Design (Factorial in CRD) โดยที่ปัจจัยแรกคือ สายพันธุ์หมอน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ เชียงใหม่ และบุรีรัมย์ 60 ปัจจัยที่สองเป็นระยะเวลาสุก 2 ระยะ ได้แก่ ผลสีด้า-แดง และผลสีดำล้วน วิเคราะห์อย่างละ 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวน Analysis of Variance (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของตัวอย่างด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

2. ศึกษาผลของสายพันธุ์หม่อน และปริมาณกรดในน้ำหมักต่อคุณภาพของไวน์หม่อน

ใช้ผลหม่อนสุกสีดำล้วน 2 สายพันธุ์ คือสายพันธุ์เชียงใหม่ และสายพันธุ์บุรีรัมย์ 60 นำหม่อนแต่ละสายพันธุ์ ตีปั่นโดยใช้เครื่องแยกกาก (pulper finisher) ซึ่งนำหม่อนผสมน้ำ โดยมีอัตราส่วนของหม่อนต่อน้ำสะอาดตามปริมาณกรด 4 ระดับคือ 2.5, 3.0, 3.5 และ 4.0 กรัมต่อลิตรตามลำดับและปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด 20 องศาบริกซ์จากนั้นเติมโคแอมโมเนียมไฮโดรฟอสเฟต ร้อยละ 0.03 เอนไซม์เพคตินเอส 0.11 กรัมต่อกิโลกรัม และโปแตสเซียมเมตาไบซัลไฟท์ 150 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นบรรจุลงในถังหมัก เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 24 ชั่วโมง จึงใส่หัวเชื้อเริ่มต้นที่เตรียมไว้ร้อยละ 5 ต่อปริมาณน้ำหม่อน เมื่อหมักครบ 7 วัน แยกกากและน้ำหมักออก จากนั้นให้มีการหมักต่อจนได้เป็นชนิดของไวน์ไม่หวาน และทำให้ใสด้วยเบนโทไนท์ร้อยละ 0.1 เติมเมตาไบซัลไฟท์ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

หัวเชื้อยีสต์เริ่มต้นเตรียมโดยชั่งหม่อนแต่ละสายพันธุ์ผสมน้ำ ในอัตราส่วนหม่อนต่อน้ำเท่ากับ 1:3 ปรับปริมาณกรดทั้งหมดเป็น 4.0 กรัมต่อลิตร และปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด 20 องศาบริกซ์ นำไปต้มโดยใช้อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วบรรจุภาชนะโดยใช้สำลีปิดจุก และหุ้มด้วยกระดาษอะลูมิเนียมฟอยล์ ทำให้เย็น จนอุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิห้อง) เติมยีสต์แห้ง *S. cerevisiae* สายพันธุ์ Lalvin K1V-1116 สำหรับหมักไวน์ (active dried yeast) 0.1 กรัมต่อลิตร ต่อปริมาณน้ำหม่อนที่เตรียม ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมง จึงจะได้หัวเชื้อเริ่มต้นพร้อมหมักไวน์

หลังเติมหัวเชื้อเริ่มต้นลงในน้ำหม่อนแล้ว นำไปหมักไว้ที่อุณหภูมิห้อง ระหว่างหมักนำไวน์หม่อนมาตรวจสอบวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี ทุก ๆ 3 วัน ดังนี้

- น้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณกรด ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (TSS) และ ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ตรวจสอบเช่นเดียวกับข้อ 1

- ปริมาณแอลกอฮอล์ โดยใช้เครื่อง Ebulliometer

ศึกษาคุณภาพทางด้านกายภาพ และเคมีในขั้นตอนสุดท้ายของกระบวนการหมัก ดังนี้

- ค่าสี ระบบ L*a*b*

- ปริมาณซัลเฟอร์ทั้งหมด (total sulfur) และซัลเฟอร์อิสระ (free sulfur) ตามวิธีของ Iland *et al.* (1993)

วางแผนการทดลองแบบ 2 x 4 Factorial in CRD โดยที่ปัจจัยแรกคือ สายพันธุ์หม่อน 2 สายพันธุ์ได้แก่ เชียงใหม่ และบุรีรัมย์ 60 ปัจจัยที่สองเป็นปริมาณกรด 4 ระดับ ได้แก่ 2.5 3.0 3.5 และ 4.0 กรัมต่อลิตร นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของตัวอย่างด้วยวิธี DMRT

ศึกษาคุณภาพทางด้านประสาทสัมผัส โดยใช้ผู้ทดสอบชิมที่ผ่านการฝึกฝนจำนวน 15 คน ทำการวิเคราะห์ให้คะแนนด้าน ความใส สี ความซับซ้อนของกลิ่น รสชาติ ความเป็นกรด ซ้อบพร่อง และคุณภาพทั่วไป ในแต่ละคุณภาพมีการกำหนดคะแนนโดยมีการให้คะแนน 5-0 จากชอบมากถึงไม่ชอบมากตามลำดับ แล้วทำการประเมินคุณภาพ จากคะแนนที่ได้คูณกับน้ำหนักของปัจจัยคุณภาพ ตามวิธีของ Yair. (1996) วางแผนการทดลองแบบ 2x4 Factorial in Randomized Complete Block Design (Factorial in RCBD) โดยที่ปัจจัยแรกคือ สายพันธุ์ หม่อน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ เชียงใหม่ และบุรีรัมย์ 60 ปัจจัยที่สองเป็นปริมาณกรด 4 ระดับ ได้แก่ 2.5, 3.0, 3.5 และ 4.0 กรัมต่อลิตร นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของตัวอย่างด้วยวิธี DMRT

3. ผลของสายพันธุ์ยีสต์ต่อคุณภาพไวน์หม่อน

ศึกษาสายพันธุ์หม่อน ได้แก่ สายพันธุ์บุรีรัมย์ 60 โดยทำการหมักไวน์ตามวิธีในข้อ 2 ซึ่งใช้เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* สำหรับหมักไวน์เป็นยีสต์แห้ง (active dry yeast) จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ Lalvin EC-1118 สายพันธุ์ Lalvin K1V-1116 สายพันธุ์ Fermivin (7013) และสายพันธุ์ Fermivin PDM (9068) เตรียมน้ำหม่อนสำหรับหมักเช่นเดียวกับข้อ 2 ติดตามผลระหว่างการหมัก โดยเก็บตัวอย่างไวน์ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางด้านเคมีทุก ๆ 3 วัน ตรวจสอบคุณภาพทางด้านกายภาพ และเคมีในขั้นตอนสุดท้ายของกระบวนการหมัก วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) วิเคราะห์อย่างละ 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของตัวอย่างด้วยวิธี DMRT และศึกษาคุณภาพทางด้านประสาทสัมผัส เช่นเดียวกับวิธีในข้อ 2 โดยวางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของตัวอย่าง ด้วยวิธี DMRT

4. ผลของระยะเวลาสุกต่อคุณภาพของไวน์หม่อน

ศึกษาสายพันธุ์หม่อน ได้แก่ สายพันธุ์บุรีรัมย์ 60 โดยทำการหมักไวน์ตามวิธีในข้อ 2 ซึ่งศึกษาระยะเวลาสุก 2 ระยะ คือ ผลหม่อนที่มีสีดำ-แดง และสีดำล้วน ใช้สายพันธุ์ยีสต์ที่เหมาะสมจากข้อ 3 เพื่อหมักไวน์ ติดตามผลระหว่างการหมักโดยเก็บตัวอย่างไวน์ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางด้านเคมีทุก ๆ 3 วัน ตรวจสอบคุณภาพทางด้านกายภาพ และเคมีในขั้นตอนสุดท้ายของกระบวนการหมัก วางแผนการทดลองโดยวิธี T-test นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวน ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของตัวอย่าง ศึกษาคุณภาพทางด้านประสาทสัมผัส เช่นเดียวกับวิธีในข้อ 2