

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุ

3.1.1 วัตถุดิบ

1. ส้มสายน้ำผึ้ง จากตลาดเมืองใหม่ อ. เมือง จ. เชียงใหม่
2. น้ำดื่ม จากบริษัท เชียงใหม่โพสตา (1992) จำกัด
3. น้ำตาลทราย จากบริษัท น้ำตาลมิตรผล จำกัด
4. น้ำตาลทรายแดง จากบริษัท น้ำตาลมิตรผล จำกัด
5. กากน้ำตาล จากโรงงานน้ำตาลลำปาง อ. เกาะคา จ. ลำปาง

3.1.2 จุลินทรีย์

ยีสต์ผงสายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae*

สายพันธุ์ทางการค้าชื่อ Lalvin V 1116 (Lallemand Inc.)

3.2 อุปกรณ์

3.2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิตสุรากลั่น

1. หม้ออะลูมิเนียม
2. ถังหมักเป็นถังก้อนน้ำดื่มชนิดใส (polyethylene terephthalate) ขนาด 6 ลิตร
3. แอร์ล็อก (air lock)
4. เทอร์โมมิเตอร์ (thermometer)
5. เครื่องชั่งแบบสปริงขนาด 5, 10 และ 60 กิโลกรัม
6. เครื่องชั่งไฟฟ้า ทศนิยม 3 ตำแหน่ง (Precisa, Switzerland)
7. เต้าแก๊ส
8. ชุดเครื่องกลั่นสุราแบบหม้อต้ม (ผลิตจากห้างหุ้นส่วนจำกัด โคราชทรีท เคมิคอล)
9. ชุดเครื่องกลั่นแบบลำดับส่วน
10. ชุดเครื่องกลั่นอย่างง่าย เป็นชุดเครื่องกลั่นที่ทำจากแก้ว ซึ่งใช้ในห้องปฏิบัติการ

3.2.2 อุปกรณ์ที่ใช้วิเคราะห์คุณภาพ

1. เครื่องชั่งไฟฟ้า ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius, Germany)
2. ตู้อบลมร้อน (Binder, Germany)
3. ชุดวิเคราะห์ไขมัน (Soxhlet apparatus)
4. เครื่องกลั่นไนโตรเจน (Tecator, Sweden)
5. เตาไฟฟ้า (Heidolph, Germany)
6. เครื่องวัดปริมาณแอลกอฮอล์แบบเทียบหาจุดเดือด (Ebulliometer)
7. เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด Hand refractometer (ATAGO, Japan)
8. เครื่องวัดปริมาณแอลกอฮอล์แบบมือถือ (MT-380, China)
9. เครื่องแก้วที่ใช้ในการวิเคราะห์ ได้แก่ บีกเกอร์ บิวเรต กระจบอกตวง และ ปิเปต เป็นต้น
10. เครื่องหมุนเหวี่ยง (Rotena 46 R, Germany)
11. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Memmert, Germany)

3.3 สารเคมี

1. เอนไซม์เซลลูเลสชนิดน้ำ (Cellubrix[®]) ; Food grade (Novozymes, Denmark)
2. เอนไซม์เพคตินเอส (Pectinex[®]) ; Food grade (Novozymes, Denmark)
3. Copper sulfate ; AR grade (Merck, Germany)
4. Sodium potassium tartrate ; AR grade (Ajax Finechem, Australia)
5. Zine acetate dihydrate ; AR grade (Ajax Finechem, Australia)
6. Potassium ferrocyanide ; AR grade (Ajax Finechem, Australia)
7. Methylene blue ; AR grade (Fisher Scientific, UK)
8. Phenolphthalein ; AR grade (Fisher Scientific, UK)
9. Sodium hydroxide ; AR grade (Merck, Germany)
10. Boric acid ; AR grade (Merck, Germany)
11. Sulfuric acid ; AR grade (Merck, Germany)
12. Acetic acid ; AR grade (Merck, Germany)
13. Petroleum ether ; AR grade (LAB-SCAN, Ireland)
14. Potassium metabisulfite ; Food grade (Ajax Finechem, Australia)
15. Diammonium phosphate ; Food grade (Ajax Finechem, Australia)

3.4 วิธีการทดลอง

การศึกษาผลของเอนไซม์ ชนิดน้ำตาล และชนิดเครื่องกลั่นต่อคุณภาพของสุรากลั่นจากส้มสายน้ำผึ้ง แบ่งการวิจัยออกเป็น 5 ขั้นตอนดังนี้

3.4.1 ศึกษาคุณภาพทางเคมีของเนื้อส้มสายน้ำผึ้ง

สุ่มตัวอย่างส้มสายน้ำผึ้ง แล้วแกะเปลือกออก ตรวจสอบวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีโดยทำการวิเคราะห์ 3 ข้อ ดังนี้

- ความชื้น โดยการอบที่ 105 องศาเซลเซียส (AOAC, 2000)
- โปรตีน โดยวิธี Kjeldahl method (AOAC, 2000)
- ไขมัน โดยการสกัดด้วยตัวทำละลาย ไดเอทิลอีเทอร์ (Diethyl ether extract method ; AOAC, 2000)
- เถ้า โดยวิธีเผาตัวอย่างที่อุณหภูมิ 525-550 องศาเซลเซียส (AOAC, 2000)
- คาร์โบไฮเดรต โดยการคำนวณอาศัยผลต่างระหว่าง 100 กับผลรวมของร้อยละความชื้น โปรตีน ไขมัน และเถ้า (AOAC, 2000)

3.4.2 ศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการเตรียมน้ำหมักส้มสายน้ำผึ้ง

3.4.2.1 ศึกษาผลของการผสมเปลือกส้มในน้ำหมักส้มสายน้ำผึ้ง

ทำการเตรียมน้ำหมักโดยใช้ส้มสายน้ำผึ้งที่ทำการแกะเปลือกออก หลังจากนั้นบีบด้วยมือให้แตกและ แล้วเติมน้ำตาลทรายขาวเพื่อปรับปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดให้เป็น 22 °Brix เติมน้ำเปลือกส้มสายน้ำผึ้ง (ที่ผ่านการล้างด้วยน้ำสะอาด นำเชื้อด้วยโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟด์ ความเข้มข้น 1000 ppm จากนั้นใส่ให้แห้ง) ลงไปในปริมาณที่แตกต่างกัน 4 ระดับคือร้อยละ 10, 15 และ 20 ของน้ำหมัก บรรจุลงถังหมัก ทุกถังเติมโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟด์ และไดแอมโมเนียมฟอสเฟต ความเข้มข้น 200 ppm และ 300 ppm ตามลำดับ ทิ้งไว้เป็นเวลา 22-24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ทำการเติมหัวเชื้อยีสต์ผงทางการค้า (Laiyin V1116) เขย่าให้กระจายตัว ปิดฝาถังหมักด้วย air lock ปล่อยให้หมักที่อุณหภูมิห้อง ระหว่างหมักสุ่มตัวอย่างทำการตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีทุกวันจนถึงสิ้นสุดการหมัก ดังนี้

- ปริมาณของแข็งที่ละลายได้โดยใช้ Hand refractometer
- ปริมาณแอลกอฮอล์โดยใช้เครื่องวัดปริมาณแอลกอฮอล์แบบเทียบหาจุดเดือด
- ปริมาณกรดทั้งหมด (Total acidity) โดยการไตเตรทด้วย 0.1 N NaOH

หลังสิ้นสุดการหมัก กรองแยกกากออก คำนวณหาปริมาณน้ำสำที่ได้จากสูตรในภาคผนวก ง ข้อ 2

นำน้ำส้มที่ได้ไปกลั่นด้วยเครื่องกลั่นอย่างง่าย โดยแยกแอลกอฮอล์ส่วนแรกที่กลั่นได้ ร้อยละ 0.8 ของน้ำส้มที่เข้ากลั่นทิ้งไป เพื่อกำจัดสารที่ระเหยง่ายรวมทั้งเมทิลแอลกอฮอล์ (Hernandes–Gomes and Others, 2003) กลั่นต่อไปเรื่อยๆจนปริมาณแอลกอฮอล์ในสุราที่กลั่น ได้ลดลงถึงร้อยละ 40 (v/v) จึงหยุดกลั่น ซึ่งวัดโดยเครื่องวัดปริมาณแอลกอฮอล์แบบมือถือ วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design : CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวนแล้วเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DNMRT) (ไพโรจน์, 2547) นำสุรากลั่นที่ได้ไปตรวจคุณภาพด้านต่างๆ ดังนี้

- ปริมาตรที่กลั่นได้ (mL)
- ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ (v/v)
- ปริมาตรหลังปรับเป็นสุรากลั่นร้อยละ 40 (v/v)
- ผลผลิตแอลกอฮอล์จากผลส้ม (ร้อยละ, v/v) คำนวณได้จากสูตรในภาคผนวก ง ข้อ 4
- ประสิทธิภาพของการกลั่น คำนวณได้จากสูตร ในภาคผนวก ง ข้อ 5

นำสุรากลั่นที่ได้มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นเพื่อปรับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์เป็นร้อยละ 40 (v/v) แล้วทำการทดสอบทางประสาทสัมผัส โดยผู้ทดสอบชิมจำนวน 15 คน ให้คะแนนโดยวิธี Hedonic scaling test 1-9 (ไพโรจน์, 2539) (1 = ไม่ชอบมากที่สุด 9 = ชอบมากที่สุด) ทดสอบคุณภาพด้านความใส กลิ่นส้ม และการยอมรับรวม วางแผนการทดลองแบบสุ่มบล็อกสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design : RCBD) วิเคราะห์ความแปรปรวนแล้วเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DNMRT)

3.4.2.2 ศึกษาผลของการเติมเปลือกส้มรูปแบบต่างๆในการผลิตสุรากลั่นส้มสายน้ำผึ้ง

ทำการเตรียมน้ำหมักโดยใช้เฉพาะเนื้อส้มสายน้ำผึ้งที่บีบให้แตกและ แล้วเติมน้ำตาลปรับปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเป็น 22 °Brix ศึกษาผลของ 2 ปัจจัยเกี่ยวกับการเติมเปลือกส้ม ได้แก่ปัจจัยแรกเป็นลักษณะของเปลือกส้มซึ่งมี 2 แบบคือ เปลือกส้มสด และเปลือกส้มแช่แข็ง ปัจจัยที่ 2 คือ ขั้นตอนในการเติมเปลือกส้ม 2 ระยะคือ เติมพร้อมการเตรียมน้ำหมัก และเติมในน้ำส้มก่อนการกลั่น ปริมาณเปลือกส้มที่เติมมีค่าเท่ากันคือ ร้อยละ 10 ของน้ำหมัก ทุกถังเติมโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ และไดแอมโมเนียมฟอสเฟต ในปริมาณความเข้มข้นเท่ากับในข้อ

3.4.2.1 แล้วทำการหมักและกลั่นเช่นเดียวกับข้อ 3.4.2.1 วางแผนการทดลองแบบ 2x2 Factorial in CRD วิเคราะห์ความแปรปรวนแล้วเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DNMRT)

หลังเจือจางปรับความเข้มข้นของสุรากลั่นเป็นร้อยละ 40 (v/v) นำไปทดสอบทางประสาทสัมผัสวิธี Hedonic scaling test 1-9 โดยทดสอบคุณภาพเช่นเดียวกับข้อ 3.4.2.1 วางแผนการทดลองแบบ 2x2 Factorail in RCBD วิเคราะห์ความแปรปรวนแล้วเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DNMRT)

3.4.2.3 ศึกษาปริมาณเปลือกส้มสายน้ำผึ้งที่เหมาะสมในการเติมลงในน้ำลำ

เมื่อได้ชนิดของเปลือก และขั้นตอนในการเติมเปลือกลงในน้ำหมักที่เหมาะสมแล้วจากข้อ 3.4.2.2 ทำการเตรียมน้ำหมักส้มสายน้ำผึ้งเช่นเดียวกับข้อ 3.4.2.2 แต่เติมเปลือกส้มลงในน้ำลำในปริมาณที่เติม 4 ระดับคือร้อยละ 0, 5, 10 และ 15 จากนั้นทำการหมัก และกลั่นเช่นเดียวกับข้อ 3.4.2.1 หลังจากสิ้นสุดการหมักทำการตรวจคุณภาพทางเคมี ทำการเปรียบเทียบคุณภาพทางเคมี และคุณภาพทางประสาทสัมผัส เช่นเดียวกับข้อ 3.4.2.1 วางแผนการทดลอง และวิเคราะห์ผลทางสถิติเช่นเดียวกับข้อ 3.4.2.1

3.4.3 ศึกษาผลของการใช้เอนไซม์ต่อการเพิ่มประสิทธิภาพในการเตรียมน้ำหมักส้มสายน้ำผึ้ง

3.4.3.1 ศึกษาผลการใช้เอนไซม์เซลลูเลสในน้ำหมักส้มสายน้ำผึ้ง

เตรียมน้ำหมักส้มสายน้ำผึ้ง เช่นเดียวกับข้อ 3.4.2 ทำการย่อยโดยเอนไซม์เซลลูเลส ทำการย่อยนาน 18 ชั่วโมง ศึกษาผลของปัจจัย 2 อย่างคือ ปัจจัยแรกเป็นอุณหภูมิในการย่อย 3 ระดับคือ อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) ควบคุมอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมง และการเพิ่มอุณหภูมิเป็น 60 องศาเซลเซียสแล้วปล่อยให้เย็น ปัจจัยที่ 2 คือ ปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสที่เติม 5 ระดับคือ 0, 100, 500, 1000 และ 1500 ppm เก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมง ตรวจวัดคุณภาพทางเคมี ดังนี้

- ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Lane & Eynon (AOAC, 2000)
- ปริมาณของแข็งที่ละลายได้โดยใช้ Hand refractometer

เปรียบเทียบคุณภาพทางเคมี วางแผนการทดลองแบบ Factorail in CRD เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DNMRT) โดยการทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.4.3.2 ศึกษาผลของการใช้เอนไซม์เพคตินเอสในน้ำหมักสัสมายน้ำผึ้ง

เตรียมน้ำหมักสัสมายน้ำผึ้ง เช่นเดียวกับข้อ 3.4.2 ทำการย่อยด้วยเอนไซม์เพคตินเอส 4 ระดับในปริมาณที่ต่างกันคือ 0, 50, 150 และ 200 ppm ทำการย่อยที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) โดยใช้เวลา 12 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 3000 รอบ เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนใสเพื่อวัดปริมาณน้ำที่สกัดได้ เมื่อสิ้นสุดกระบวนการทำการตรวจวัดปริมาณน้ำที่สกัดได้ (ร้อยละ, v/v)

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design : CRD) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DNMRT)

3.4.3.3 ศึกษาผลของการใช้เอนไซม์เซลลูเลสร่วมกับเพคตินเอส

จากสถานะที่เหมาะสมในการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส และเพคตินเอสในข้อ 3.4.3.1 และ 3.4.3.2 นำมาทำการย่อยเปรียบเทียบกันกับการใช้เอนไซม์ผสมทั้ง 2 ชนิดในปริมาณที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษา เมื่อสิ้นสุดการย่อย ทำการตรวจคุณภาพ วางแผนการทดลองและเปรียบเทียบ เช่นเดียวกับข้อ 3.4.3.1

3.4.4 ศึกษาผลของชนิดน้ำตาลในการเติมลงในน้ำหมักสัสมายน้ำผึ้ง

ทำการเตรียมน้ำหมักโดยใช้สัสมายน้ำผึ้งที่ทำการแกะเปลือกออก หลังจากนั้นบีบด้วยมือให้แตกและ แล้วเติมน้ำตาลที่แตกต่างกัน 3 ชนิดลงในน้ำหมัก คือ น้ำตาลทรายขาว น้ำตาลทรายแดง และกากน้ำตาล เพื่อปรับปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดในน้ำหมักให้เป็น 22° Brix หลังจากนั้นเติมโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ และไดแอมโมเนียมฟอสเฟต ความเข้มข้น 200 ppm และ 300 ppm ตามลำดับ ปล่อยให้หมักในสภาพอุณหภูมิห้อง ในวันที่สิ้นสุดการหมักทำการตรวจคุณภาพเช่นเดียวกับข้อ 3.4.2.1 วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design : CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวนแล้วเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DNMRT)

นำสุราสัสมายน้ำผึ้งไปทำการทดสอบทางประสาทสัมผัส โดยผู้ทดสอบชิมจำนวน 15 คน ให้คะแนนโดยวิธี Hedonic scaling test 1-9 โดยทำการทดสอบคุณภาพและวางแผนการทดลอง เช่นเดียวกับข้อ 3.4.2.1

3.4.5 ศึกษาชนิดของเครื่องกลั่นในการกลั่นสุราส้มสายน้ำผึ้ง

จากวิธีการที่เหมาะสมในข้อ 3.4.2, 3.4.3 และ 3.4.4 เลือกวิธีการที่เหมาะสมในการเตรียมน้ำหมัก และทำการหมักให้เกิดแอลกอฮอล์ เมื่อสิ้นสุดการหมัก นำน้ำค่าที่ได้มากลั่นด้วยเครื่องกลั่น 2 ชนิด ได้แก่ เครื่องกลั่นแบบหม้อต้ม (pot still distillator) และชุดเครื่องกลั่นลำดับส่วน (fractional distillator) ทำการเปรียบเทียบคุณภาพของสุรากลั่นที่ได้จากการเครื่องกลั่นทั้ง 2 ชนิด ในด้านต่างๆ ดังนี้

- ปริมาตรที่กลั่นได้ (mL)
- ปริมาณแอลกอฮอล์ (ร้อยละ, v/v)
- ประสิทธิภาพของการกลั่น (ร้อยละ, v/v)
- ผลผลิตแอลกอฮอล์จากผลส้ม (ร้อยละ, v/v)
- ต้นทุนการผลิตหลังเจือจางปรับให้เป็น 40 (v/v) (บาท/ลิตร)

หลังจากนั้นนำสุราส้มสายน้ำผึ้งที่ได้ทั้ง 2 ตัวอย่าง ส่งตรวจวิเคราะห์ตามมาตรฐานของสุรากลั่น มอก. 2088/2544 คือ ปริมาณฟลูเชลอลอยด์ และเมทิลแอลกอฮอล์ จากสถานบริการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (สวท.มช.)

นำสุราส้มสายน้ำผึ้งทั้ง 2 ตัวอย่าง มาทำการทดสอบคุณภาพด้านประสาทสัมผัส โดยวิธี Hedonic scaling test โดยผู้ทดสอบชิมจำนวน 15 คน ทดสอบคุณภาพด้านความใส กลิ่นส้ม และการยอมรับรวม วางแผนการทดลองแบบสุ่มบล็อกสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design : RCBD) วิเคราะห์ความแปรปรวนแล้วเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DNMRT)



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved