

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุ

3.1.1 วัตถุดิบ

1. หัวมันฝรั่ง สายพันธุ์ สปันต้า และแอตแลนติก หัวมันฝรั่งที่นำมาใช้เป็นหัวมันฝรั่งที่แก่จัด ซึ่งได้มาจากสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 1 จังหวัดเชียงใหม่

2. มะนาว

3. ส้มสายพันธุ์โอเชียน สายน้ำผึ้ง และสีทอง

4. วอดก้าในท้องตลาด ยี่ห้อ ABSOLUTE VODKA (บริษัท Absolute, Sweden)

5. วอดก้าในท้องตลาด ยี่ห้อ LARIOS VODKA (บริษัท Larios, Spain)

3.1.3 จุลินทรีย์

1. ลูกแป้งสุราจากอำเภอเมือง จังหวัดแพร่ (พร 1)

2. ลูกแป้งสุราจากอำเภอสอง จังหวัดแพร่ (แพร่ 2)

3. ลูกแป้งสุราจากอำเภอเมือง จังหวัดเชียงราย

4. ยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ทางการค้า Fermevin, Fermeblance และ V1116 (หจก. โอ. วี. เคมีคอล แอน ซัพพลาย จังหวัดเชียงใหม่)

5. เชื้อรา สายพันธุ์ *Aspergillus niger* และสายพันธุ์ *Aspergillus oryzae* (จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย)

3.2 อุปกรณ์

3.2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ผลิตวอดก้า

1. หม้ออะลูมิเนียมขนาด 30×30 เซนติเมตร

2. ไม้พาย

3. ถังน้ำ ขนาด 20 ลิตร

4. เครื่องปั่นไฟฟ้า (National)

5. เครื่องชั่งแบบสปริง (ผลิตภายในประเทศ)

6. เครื่องชั่งทศนิยม 3 ตำแหน่ง (Precisa, XT 320M)
7. เตาแก๊ส
8. ชุดเครื่องกลั่นสุรา (ผลิตจากบริษัทห้างหุ้นส่วน โคราชทรีท เคมีคอล จำกัด)
9. ชุดเครื่องกลั่นขนาดเล็ก
10. ชุดเครื่องกรอง (Buon Vino Mini Jet, BUON VINO MFG. INC., Canada)

3.2.2 .อุปกรณ์ที่ใช้วิเคราะห์คุณภาพ

1. เครื่องวัดสี (Chroma meter, Minolta Model CR-300, Japan)
2. กระบอกตวง ขนาด 250 มิลลิลิตร
3. เวอร์เนีย คาร์ลิปเปอร์ (Vernier caliper) (Tricle Bramd 0-150mm ,0.6 in.)
4. เครื่องชั่งทศนิยม 3 ตำแหน่ง (Precisa, XT 320M)
5. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven, Model ULM 500)
6. เครื่องกลั่นโปรตีน (Buchi, Model 323)
7. pH meter (Hanna instrument, Model HI 9321)
8. อีบูลิโอมิเตอร์ (Ebuliometer) (Patrick *et al*, 2000)
9. สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) (Thermo Spectroic, Model BIOMATE 5)
10. เครื่องแก้ว

3.3. สารเคมี

1. เอนไซม์ แอลฟาอะไมเลส (Termamyl SC, บริษัท NOVOZYM)
2. เอนไซม์กลูโคอะไมเลส (SAN Super 240L, บริษัท NOVOZYM)
3. ถ่านกัมมันต์ชนิดผง (Commercial grade, หจก. โอ. วี. เคมีคอล แอน ซัพพลาย จังหวัด เชียงใหม่)
4. ถ่านกัมมันต์ชนิดเม็ดขนาด 3.5-3.7 มิลลิลิตร (1) (ยี่ห้อ Donate, บริษัท สกายวอเตอร์ ทรีทเมนต์ จำกัด
5. ถ่านกัมมันต์ชนิดเม็ดขนาด 0.8-2.4 มิลลิลิตร (2) (ยี่ห้อ AKTIV, ห.จ.ก. ลานาลิติก วอเตอร์ เวอร์ค)

3.4 วิธีการทดลอง

การศึกษาผลของสายพันธุ์มันฝรั่ง การย่อยแป้ง และการหมักต่อคุณภาพของวอดก้า แบ่งการวิจัยออกเป็น 6 ขั้นตอนดังนี้

3.4.1. ศึกษาคุณภาพของหัวฝรั่ง

ทำการศึกษาโดยนำมันฝรั่ง 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์แอตแลนติกและสายพันธุ์สปุ่นต้า ที่ปลูกในเขตพื้นที่ภาคเหนือ ทำการลอกเปลือกแล้วปั่นละเอียดหลังจากนั้น ทำการศึกษาคุณภาพดังนี้

1) ศึกษาคุณภาพทางด้านกายภาพ

- สีผิวโดยใช้เครื่อง Chromameter ระบบ L* a* b* (Chromameter, Minolta Model CR-300, Japan)
- ความหนาแน่น (กิโลกรัม/ลิตร)
- ขนาดหัวโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางและความยาว (Vernier caliper, Tricle Bramd 0-150 mm)
- น้ำหนักของหัวโดยใช้เครื่องชั่งความละเอียดทศนิยม 3 ตำแหน่ง

2) ศึกษาคุณภาพทางด้านเคมี

- ความชื้นโดยวิธีการใช้ตู้อบลมร้อน (AOAC, 2000)
- โปรตีนโดยวิธี Kjedahl Method (AOAC, 2000)
- ไขมันโดยวิธีโรส-กอตต์เลียบ (AOAC, 2000)
- เถ้าโดยวิธีเผาตัวอย่าง ที่อุณหภูมิ 525-550 องศาเซลเซียส (AOAC, 2000)

- คาร์โบไฮเดรตโดยการคำนวณ (AOAC, 2000)
- ปริมาณแป้งโดยวิธี Phenol-sulfuric method (Dobois *et al.*, 1956)
- ปริมาณอะไมโลสโดยวิธี Iodine blue value (Juliano, 1971)
- ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Lane & Eynon (AOAC, 2000)

นำผลวิเคราะห์ทางด้านคุณภาพจากทั้ง 2 สายพันธุ์ เปรียบเทียบโดยทำการทดลอง

3 ซ้ำ วางแผนการทดลองแบบ Student ' t และทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย

3.4.2 ศึกษาการย่อยแป้งและการหมักให้เกิดแอลกอฮอล์โดยใช้ลูกแป้งเหล้า

ใช้หัวมันฝรั่งสายพันธุ์แอตแลนติก ปอกเปลือกแล้วหั่นให้เป็นรูปร่าง 3 แบบ คือ ขึ้นขนาดใหญ่ (1×1 นิ้ว) ขนาดกลาง (สับหยาบ) และขนาดเล็ก (บดละเอียด) ซึ่งน้ำหนักอย่างละ 3 กิโลกรัม นำไปนึ่งด้วยไอน้ำโดยใช้ลังถึงจนสุก แล้วผึ่งไว้ให้เย็นหลังจากนั้นนำมันฝรั่งนึ่งทุกแบบคลุกด้วยลูกแป้งเหล้าที่บดละเอียดแล้ว ที่จัดหามาจาก 3 แหล่ง ได้แก่ ลูกแป้งจากจังหวัดเชียงราย ลูกแป้งจากจังหวัดแพร่ 1 และลูกแป้งจากจังหวัดแพร่ 2 ในอัตราส่วน มันฝรั่ง 1 กิโลกรัมต่อลูกแป้ง 1 ลูก (มนตรี, 2521) ทำการทดลองอย่างละ 3 ซ้ำ ปล่อยให้มีการเจริญของเชื้อในสภาพอุณหภูมิห้องนาน 4 วัน แล้วเติมน้ำสะอาดลงไป 0.25 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักมันฝรั่ง ปล่อยให้หมักในสภาพอุณหภูมิห้อง จนไม่มีฟองแก๊ส หรือจนหยุดหมัก ในระหว่างการย่อยและการหมัก ทำการตรวจผลทุกๆ 3 วัน ดังนี้

- 1) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Lane & Eynon (AOAC, 2000)
- 2) ปริมาณแอลกอฮอล์ โดยใช้ อีบูลิโอมิเตอร์ (Patrick *et.al*, 2000)
- 3) ค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้ pH meter (HANNA รุ่น HI 9321)
- 4) ปริมาณกรดทั้งหมด (ในรูปกรดแลคติก)โดยใช้วิธีการไตเตรต (AOAC, 2000)
- 5) ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ โดยใช้ Hand refractometer (AOAC, 2000)

เปรียบเทียบคุณภาพต่างๆ ในระหว่างการย่อยและการหมัก วางแผนการทดลองแบบ 3×3 Factorial in CRD (Completely Randomized Design) จำนวน 3 ซ้ำ โดยมีปัจจัยต่างๆ ดังนี้ ปัจจัยที่ 1 คือ ขนาดมันฝรั่ง ปัจจัยที่ 2 แหล่งลูกแป้ง และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

3.4.3 ศึกษาการย่อยแป้งด้วยเชื้อราแล้วหมักแอลกอฮอล์โดยเชื้อยีสต์บริสุทธิ์

ใช้หัวมันฝรั่งสายพันธุ์แอตแลนติกอย่างละ 3 กิโลกรัม ปอกเปลือกแล้วทำการสับให้มีขนาดหยาบ หลังจากนั้นนำไปนึ่งให้สุกด้วยลังถึง แล้วผึ่งทิ้งไว้ให้เย็น หลังจากนั้นทำการคลุกด้วยกล้าเชื้อรา 2 สายพันธุ์ที่เตรียมไว้ (ภาคผนวก จ) ได้แก่สายพันธุ์ *A. oryzae* และ *A. niger* จากนั้นทำการเพาะที่อุณหภูมิห้องไว้วัน 4 วันสังเกตว่ามีน้ำหมักเกิดขึ้น แล้วทำการเติมน้ำสะอาดลงไป 0.25 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักมันฝรั่ง และถ่ายกล้าเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* บริสุทธิ์ชนิดผงสายพันธุ์ทางการค้า 3 สายพันธุ์ที่เตรียมไว้ (ภาคผนวก จ) ได้แก่ Fermevin Fermeblance และ V1116 จำนวน 0.2 กรัมต่อลิตร ปล่อยให้หมักในสภาพอุณหภูมิห้อง ในระหว่างการย่อยและการหมัก ทำการตรวจผล ดังข้อ 3.2.2

เปรียบเทียบคุณภาพต่างๆในระหว่างการย่อยและการหมัก วางแผนการทดลองแบบ 2×3 Factorial in CRD (Factorial in Completely Randomized Design) จำนวน 3 ซ้ำ โดยมีปัจจัยต่างๆ ดังนี้ ปัจจัยที่ 1 คือ สายพันธุ์เชื้อรา ปัจจัยที่ 2 สายพันธุ์ยีสต์ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

3.4.4 ศึกษาการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์แล้วหมักแอลกอฮอล์โดยเชื้อยีสต์บริสุทธิ์

ใช้หัวมันฝรั่งสายพันธุ์แอตแลนติก อย่างละ 3 กิโลกรัม ปอกเปลือกแล้วทำการบดละเอียดผสมกับน้ำ 0.25 เท่าของน้ำหนักมันฝรั่ง ได้เป็นน้ำมันฝรั่ง หลังจากนั้นนำไปต้มและกวนในหม้ออะลูมิเนียม (ขนาด 30×30 เซนติเมตร) ให้สุกโดยสังเกตการเกิดเจล แล้วทำการเติมเอนไซม์ทางการค้า 2 ชนิดคือเอนไซม์ Termamyl SC (α -amylase) และเอนไซม์ SAN Super 240L (glucoamylase) โดยทำการเติมเอนไซม์ Termamyl SC (α -amylase) ในขณะเจลของแป้งร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.0-5.7 จำนวน 0.04 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักมันฝรั่ง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง และทำการเติมเอนไซม์ SAN Super240L (glucoamylase) เมื่ออุณหภูมิของน้ำแป้งลดลงเป็น 55 องศาเซลเซียส ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.0-6.0 จำนวน 0.078 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักมันฝรั่ง ตั้งทิ้งไว้จนถึงอุณหภูมิห้อง แล้วทำการเติมหัวเชื้อยีสต์ผง (*Saccharomyces cerevisiae*) สายพันธุ์ทางการค้าที่เตรียมไว้ (ภาคผนวก จ) 3 สายพันธุ์ ได้แก่ Fermevin Fermeblance และ V1116 จำนวน 0.2 กรัมต่อลิตรของน้ำหมัก ปล่อยให้หมักที่สภาวะอุณหภูมิห้อง จนไม่เกิดฟองแก๊ส หรือจนหยุดหมักในระหว่างการย่อยและการหมัก ทำการตรวจสอบผลดังข้อ 3.2.2

เปรียบเทียบคุณภาพต่างๆในระหว่างการย่อยและการหมัก วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) จำนวน 3 ซ้ำ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

3.4.5 ศึกษาเปรียบเทียบปริมาณแอลกอฮอล์ที่กลั่นได้จากมันฝรั่งต่างสายพันธุ์

จากวิธีการในข้อ 3.2.1, 3.2.2 และ 3.2.3 เลือกวิธีการที่เหมาะสมมาทำการย่อยและการหมักแอลกอฮอล์จากหัวมันฝรั่งทั้ง 2 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์แอตแลนติก และสายพันธุ์สปุนต้า แล้วทำการกลั่นด้วยชุดกลั่นอย่างง่ายทำการกลั่นอย่างละ 3 ซ้ำ ทำการวิเคราะห์และคำนวณหาค่าต่างๆ ดังนี้

- 1) ผลผลิตแอลกอฮอล์ที่ได้ (%v/w)
= {ปริมาณแอลกอฮอล์ที่กลั่นได้ (มล.) / น้ำหนักมันฝรั่งหลังการปอกเปลือก (กรัม)} × 100
- 2) ปริมาณแอลกอฮอล์ที่กลั่นได้จากน้ำหมัก (%v/v)
= {ปริมาตรแอลกอฮอล์ที่กลั่นได้ (มล.) / ปริมาตรแอลกอฮอล์ในน้ำสำหลังการหมัก (มล.)} × 100

3) ปริมาณแอลกอฮอล์ที่กลั่นได้จากแป้ง (%v/w)

$$= \left\{ \frac{\text{ปริมาณแอลกอฮอล์ที่กลั่นได้ (มล.)}}{\text{น้ำหนักแป้งในมันฝรั่งที่ใช้ (กรัม)}} \right\} \times 100$$

4) ประสิทธิภาพในการผลิตแอลกอฮอล์

$$= \left\{ \frac{\text{ปริมาณแอลกอฮอล์ที่ได้จริง (\%)}}{\text{ปริมาณแอลกอฮอล์ที่ได้ตามทฤษฎี (\%)}} \right\} \times 100$$

หลังจากนั้นนำตัวอย่างแอลกอฮอล์ที่กลั่นได้ไปตรวจวิเคราะห์หาปริมาณเมทานอล (methanol) และ ฟูเซลอยล์ (fusel oil) จากสถานบริการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (สวท-มช.) นำผลวิเคราะห์ทางด้านคุณภาพจากทั้ง 2 สายพันธุ์เปรียบเทียบโดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ วางแผนการทดลองแบบ Student ' t และทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย

3.4.6 ศึกษาการปรุงแต่งกลิ่นรสของวอดก้า

1) การกำจัดกลิ่นด้วยถ่านกัมมันต์

การเลือกชนิดของถ่านกัมมันต์และระยะเวลาในการดูดกลิ่นที่เหมาะสม โดยนำแอลกอฮอล์ที่กลั่นได้มาเติมถ่านกัมมันต์ 3 แบบ คือ แซผสมกับถ่านกัมมันต์ชนิดผง ถ่านกัมมันต์ชนิดเม็ดขนาด 3.5-3.7 มิลลิเมตร และถ่านกัมมันต์ชนิดเม็ดขนาด 0.8-2.4 มิลลิเมตร โดยทำการแช่เป็นเวลา 6 12 18 และ 24 ชั่วโมง ทั้งหมด 12 หน่วยการทดลอง ในอัตราส่วนของถ่านกัมมันต์ 10 เปอร์เซ็นต์ของแอลกอฮอล์กลั่น (Jacques *et. al.*, 1995) หลังจากนั้นทำการกรองถ่านออกด้วยเครื่องกรอง ผลผลิตที่ได้นำมาทดสอบคุณภาพดังนี้

1.1) กลิ่น โดยการทดสอบทางประสาทสัมผัส โดยวิธี 5- Hedonic scaling test ใช้ผู้ทดสอบชิมที่ผ่านการฝึกฝนจำนวน 10 คนตรวจสอบคุณภาพด้านกลิ่นของวอดก้า วิเคราะห์ความแปรปรวนโดยวางแผนการทดลองแบบ 3×4 Factorial in RCBD (Factorial in Completely Randomized Block Design) โดยมีปัจจัยต่างๆ ดังนี้ ปัจจัยที่ 1 คือ ชนิดถ่านกัมมันต์ ปัจจัยที่ 2 ระยะเวลาในการแช่ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

1.2) ความใส โดยใช้เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ค่า OD 420 นาโนเมตร นำผลวิเคราะห์คุณภาพทางด้านสีจากทุกหน่วยการทดลอง วิเคราะห์ความแปรปรวนโดยวางแผนการทดลองแบบ 3×4 Factorial in CRD (Factorial Completely Randomized Design) จำนวน 3 ซ้ำ โดยมีปัจจัยต่างๆ ดังนี้ ปัจจัยที่ 1 คือ ชนิดถ่านกัมมันต์ ปัจจัยที่ 2 ระยะเวลาในการแช่ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

2) การปรุงแต่งกลิ่นวอดก้าด้วยผลไม้ประเภทส้ม

2.1) การเลือกปริมาณของผิวส้มที่เหมาะสมต่อคุณภาพด้านกลิ่นของวอดก้า โดยทำการแช่วอดก้าจากตอนที่ 1 กับผิวส้มสายพันธุ์โอเชียน ที่ระดับ 0, 5, 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาณของวอดก้า ทำการแช่ไว้ 24 ชั่วโมง (Jacques *et al.*, 1995) หลังจากนั้นนำมากลั่นอีกครั้ง เพื่อให้ได้กลิ่นส้มและเมื่อความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ 60 เปอร์เซ็นต์จึงหยุดกลั่น หลังจากนั้นทำการปรับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์เป็น 40 เปอร์เซ็นต์

ผลผลิตที่ได้นำมาเปรียบเทียบกลิ่น โดยการทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยวิธี Ranking Test ใช้ผู้ทดสอบชิมที่ผ่านการฝึกฝนจำนวน 10 คนตรวจสอบคุณภาพด้านกลิ่นของวอดก้ากลิ่นส้ม (ไพโรจน์, 2539)

2.2) การเลือกสารแต่งกลิ่นที่เหมาะสมต่อคุณภาพของวอดก้าโดยหลังจากได้ปริมาณที่เหมาะสมต่อคุณภาพด้านกลิ่นที่ผู้ทดสอบชิมยอมรับแล้ว หลังจากนั้นนำมาทดสอบชนิดของสารแต่งกลิ่นที่เหมาะสม โดยมีวัตถุดิบดังนี้คือ ผิวมะนาว ผิวส้มพันธุ์โอเชียน พันธุ์สายน้ำผึ้ง และพันธุ์สีทอง จากปริมาณของวัตถุดิบที่ผู้ทดสอบชิมยอมรับในข้อ 1 นำมาทำการแช่กับวอดก้าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมากลั่นอีกครั้ง เมื่อได้ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ 60 เปอร์เซ็นต์จึงหยุดกลั่น จากนั้นทำการปรับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์เป็น 40 เปอร์เซ็นต์

ผลผลิตที่ได้นำมาเปรียบเทียบกลิ่นรส โดยการทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยวิธี Ranking Test ใช้ผู้ทดสอบชิมที่ผ่านการฝึกฝนจำนวน 10 คนตรวจสอบคุณภาพด้านกลิ่นวอดก้ากลิ่นส้ม (ไพโรจน์, 2539)

3) การเปรียบเทียบคุณภาพของวอดก้า

3.1) การเปรียบเทียบวอดก้าที่ผลิตขึ้นกับวอดก้าในท้องตลาด โดยนำวอดก้าที่ผ่านการยอมรับในข้อ 2 มาทำการเปรียบเทียบกับวอดก้าที่ไม่มีการแต่งกลิ่น และวอดก้าในในท้องตลาด

ผลผลิตที่ได้นำมาเปรียบเทียบกลิ่นรส โดยการทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยวิธี Hedonic scaling test ใช้ผู้ทดสอบชิมที่ผ่านการฝึกฝนจำนวน 10 คนตรวจสอบคุณภาพดังนี้ กลิ่น ความใส รสชาติ การยอมรับโดยรวม (ไพโรจน์, 2539) วิเคราะห์ความแปรปรวนโดยวางแผนการทดลองแบบ RCBD (Completely Randomized Block Design) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

3.2) กำหนดต้นทุนการผลิตวอดก้าในการทดลองที่ได้รับการยอมรับจากผู้ทดสอบชิม โดยคำนวณต้นทุนจากราคามันฝรั่ง ราคาเอนไซม์ 2 ชนิด ราคาอีสต์ ราคาถ่านกัมมันต์ และค่าแรง



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright © by Chiang Mai University

All rights reserved