

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุ

3.1.1 วัตถุดิบ

1. ส้มสายน้ำผึ้ง จากตลาดเมืองใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่
2. ผิวส้มสายน้ำผึ้งจากส้มที่ไม่ผ่านการเคลือบผิว
3. ผิวส้มสายน้ำผึ้งจากส้มที่ผ่านการเคลือบผิว
4. น้ำดื่ม จากบริษัท เชียงใหม่โพลสตาร์ (1992) จำกัด
5. น้ำตาลทราย จากบริษัท น้ำตาลมิตรผล จำกัด
6. สุราวอดก้าแต่งกลิ่นส้มทางการค้า ยี่ห้อ GRAY GOOSE L'Orange (บริษัท Grey Goose, France)
7. สุราวอดก้าแต่งกลิ่นส้มทางการค้า ยี่ห้อ ABSOLUTE MANDARIN (บริษัท Absolute, Sweden)

3.1.2 ยีสต์

1. ยีสต์ผงสายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ทางการค้าชื่อ Lalvin V1116 (Lallemand Inc.)

3.2 อุปกรณ์

3.2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิตสุรากลั่น

1. หม้ออะลูมิเนียม
2. ไม้พาย
3. เครื่องปั่นไฟฟ้า
4. ถังหมัก เป็นถังน้ำดื่มชนิดไอขนาด 20 ลิตร
5. แอร์ล็อก (air lock)
6. เทอร์โมมิเตอร์ (thermometer)
7. เครื่องชั่งแบบสปริงขนาด 5,10 และ 60 กิโลกรัม

8. เครื่องชั่งไฟฟ้า ทศนิยม 3 ตำแหน่ง (Precisa, Switzerland)
9. เตาแก๊ส
10. ชุดเครื่องกลั่นสุราแบบหม้อต้ม (ผลิตจากห้างหุ้นส่วนจำกัด โคราชทรีท เคมีคอล)
11. ชุดเครื่องกลั่นอย่างง่าย เป็นชุดเครื่องกลั่นที่ทำจากแก้ว ซึ่งใช้ในห้องปฏิบัติการ
12. ฟ้าขาวบาง
13. ชุดเครื่องกรองขนาดเล็ก (Buon Vino Mini Jet, BUON VINO MFG. INC., Canada)
14. ตู้แช่แข็ง

3.2.2 อุปกรณ์ที่ใช้วิเคราะห์คุณภาพ

1. เครื่องชั่งไฟฟ้า ทศนิยม 3 ตำแหน่ง (Precisa, Switzerland)
2. เครื่องวัดปริมาณแอลกอฮอล์แบบเทียบจุดเดือด (Ebulliometer)
3. เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (hand refractometer) (ATAGO, Japan)
4. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
5. เครื่องวัดปริมาณแอลกอฮอล์แบบมือถือ (alcohol hand refractometer) (MT-380, China)
6. สเปกโทโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) (Thermo Spectroic, Model BIOMATE 5)
7. เครื่องแก้วที่จำเป็นในการวิเคราะห์ ได้แก่ ขวดรูปชมพู่ บีกเกอร์ บิวเรต กระบอกตวง และ ปิเปต เป็นต้น

3.3 สารเคมี

1. ถ่านกัมมันต์ชนิดเม็ด (เกรดทางการค้า, ห้างหุ้นส่วนจำกัด โอ.วี.เคมีคอล แอน ซัพพลาย จังหวัดเชียงใหม่)
2. ถ่านกัมมันต์ชนิดเม็ด (Bunton Bamboo Charcoal, บริษัท ชาร์โคล โสม จำกัด)
3. ถ่านกัมมันต์ชนิดเม็ด (Calgon Filtrasorb 100, ห้างหุ้นส่วนจำกัด ลานาลิติก วอเตอร์ เวอร์ค จังหวัดเชียงใหม่)
4. Sodium hydroxide; AR grade (Merck, Germany)
5. Phenolphthalein; AR grade (Fisher Scientific, UK)
6. Petroleum ether; AR grade (LAB-SCAN, Ireland)
7. Absolute ethanol, AR grade
8. Potassium metabisulfite (KMS); Food grade (Ajax Finechem, Australia)
9. Diammonium phosphate (DAP); Food grade (Ajax Finechem, Australia)

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 ศึกษาคุณภาพทางเคมี กายภาพ และองค์ประกอบของกลิ่นในสุรากลั่นจากส้มสายน้ำผึ้ง

เตรียมน้ำหมักจากส้มสายน้ำผึ้งโดยใช้โดยใช้เนื้อส้มสายน้ำผึ้งบด และปรับสภาพโดยเติมน้ำตาลทรายขาวปรับปริมาณของแข็งที่ละลายได้เป็น 22 องศาบริกซ์ เติมนิโคตินามโมเนียมฟอสเฟต (DAP) 300 ppm และโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ (KMS) 200 ppm บรรจุลงถังเตรียมเป็นน้ำหมักตั้งไว้ 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมหัวเชื้อยีสต์ลงไปร้อยละ 10 ของน้ำหมัก (หัวเชื้อยีสต์มีวิธีการเตรียมเหมือนน้ำหมัก แต่ไม่เติมโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ (KMS) และกรองเอาแต่น้ำด้วยผ้าขาวบางนำไปต้มให้เดือด ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เติมหิวเชื้อยีสต์ผง Lalvin V1116 ลงไปปริมาณ 0.05 กรัมต่อลิตรของน้ำหมักทั้งหมดตั้งไว้ 24 ชั่วโมง) เขย่าให้กระจายตัว ปิดฝาถังหมักด้วย air lock ปล่อยให้หมักที่อุณหภูมิห้อง ระหว่างหมักสุ่มตัวอย่างทำการตรวจวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายได้โดยใช้ hand refractometer และปริมาณแอลกอฮอล์โดยเครื่องวัดปริมาณแอลกอฮอล์แบบเทียบหาจุดเดือด ทุก 2 วันจนถึงสิ้นสุดการหมัก (ศราวุธ, 2550)

เมื่อสิ้นสุดการหมัก กรองแยกเอากากออกได้เป็นน้ำสำ นำน้ำสำไปกลั่นด้วยเครื่องกลั่นแบบหม้อต้ม (pot still) โดยแยกแอลกอฮอล์ส่วนแรกที่กลั่นได้ร้อยละ 1.0 (v/v) ของน้ำสำทั้งหมดที่เข้ากลั่นทิ้งไป เพื่อกำจัดสารที่ระเหยง่ายรวมทั้งเมทานอล หลังจากนั้นจึงเริ่มเก็บน้ำสุรา ทำการกลั่นจนปริมาณแอลกอฮอล์ในสุราที่กลั่นได้ลดลงถึงร้อยละ 40 (v/v) จึงหยุดการกลั่น (ศราวุธ, 2550) วัดปริมาณแอลกอฮอล์ที่กลั่นได้ทั้งหมด โดยใช้เครื่องวัดปริมาณแอลกอฮอล์แบบมือถือ (alcohol hand refractometer) แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาณแอลกอฮอล์ให้เป็นร้อยละ 40 (v/v) จากนั้นนำสุรากลั่นจากส้มสายน้ำผึ้งที่ได้ ไปวิเคราะห์คุณภาพด้านต่างๆ โดยทำการวิเคราะห์ 3 ข้อ ได้แก่

- ความใส โดยใช้เครื่องสเปคโทโฟโตมิเตอร์ ที่ค่า OD เป็น 420 นาโนเมตร (OD_{420})

(สุพรรณษา, 2548)

- ปริมาณกรดทั้งหมด (กรดแอสซิติค; กรัมต่อลิตร) โดยการไทเทรต (AOAC, 2000)

- ค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้ pH meter (AOAC, 2000)

- ปริมาณแอลกอฮอล์ (ร้อยละ v/v) โดยใช้เครื่องวัดแอลกอฮอล์แบบมือถือ

(alcohol hand refractometer)

- องค์ประกอบของสารในสุราที่กลั่นได้ โดยใช้เทคนิค Gas Chromatography-Mass

Spectrometry

- ปริมาณสารสำคัญที่สามารถระเหยได้ ได้แก่ isoamyl alcohol, isobutyl alcohol acetaldehyde, ethyl acetate, 1-propanol และ methyl alcohol โดยใช้เทคนิค Gas Chromatography (Apostolopoulou *et al.*, 2005)

3.4.2 การกำจัดกลิ่นในสุรากลั่นด้วยถ่านกัมมันต์

ศึกษาการกำจัดกลิ่นด้วยถ่านกัมมันต์โดยมีปัจจัย 2 ชนิด คือ ปัจจัยแรกเป็น ชนิดของ ถ่านกัมมันต์ 3 ชนิดคือ ถ่านกัมมันต์จากกะลามะพร้าว ถ่านกัมมันต์จากไม้ไผ่ และถ่านกัมมันต์จาก ถ่านหิน ปัจจัยที่ 2 เป็น ปริมาณการใช้ 2 ระดับ คือ ร้อยละ 10 และ 20 ของปริมาตรสุรากลั่น ทำการ แช่วถ่านกัมมันต์ในสุรากลั่นจากส้มสายน้ำผึ้งที่ผลิตขึ้นจากข้อ 3.4.1 คนให้เข้ากัน แล้วตั้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (สุพรรณษา, 2548) เมื่อครบกำหนดแล้วแยกเอาถ่านกัมมันต์ออกจากสุรากลั่นด้วยผ้าขาว บาง จากนั้นทำการกรองด้วยเครื่องกรองขนาดเล็ก วางแผนการทดลองแบบ 3×2 Factorial in CRD (Factorial in Completely Randomized Design) วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) นำ ผลผลิตที่ได้ไปตรวจสอบคุณภาพด้านต่างๆ โดยทำการวิเคราะห์ 3 ข้อ ได้แก่

- ผลผลิตที่ได้ (ร้อยละ v/v) หลังกรองด้วยผ้าขาวบาง และหลังกรองด้วยเครื่องกรอง หาได้จาก

$$\text{ผลผลิตที่ได้ (ร้อยละ v/v)} = \frac{A}{B} \times 100$$

เมื่อ A = ปริมาตรสุรากลั่นที่กรองได้หลังการแช่วถ่านกัมมันต์ (มิลลิลิตร)

B = ปริมาตรสุรากลั่นก่อนการแช่วถ่านกัมมันต์ (มิลลิลิตร)

- ความใส โดยใช้เครื่องสเปกโทโฟโตมิเตอร์ ที่ค่า OD เป็น 420 นาโนเมตร (OD_{420}) (สุพรรณษา, 2548)

- ปริมาณกรดทั้งหมด (กรดแอสติค; กรัมต่อลิตร) โดยการไทเทรต (AOAC, 2000)

- ค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้ pH meter (AOAC, 2000)

- ปริมาณแอลกอฮอล์ (ร้อยละ v/v) โดยใช้เครื่องวัดแอลกอฮอล์แบบมือถือ (alcohol hand refractometer)

- ปริมาณสารสำคัญที่สามารถระเหยได้ ได้แก่ isoamyl alcohol, isobutyl alcohol acetaldehyde, ethyl acetate, 1-propanol และ methyl alcohol โดยใช้เทคนิค Gas Chromatography (Apostolopoulou *et al.*, 2005)

ทำการทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัส โดยใช้ผู้ทดสอบชิมจำนวน 25 คน ให้คะแนนด้วยวิธี Hedonic scaling test 1-9 (1=ไม่ชอบมากที่สุด 9= ชอบมากที่สุด) ทดสอบคุณภาพด้านกลิ่นรสชาติ และการยอมรับรวม วางแผนการทดลองแบบ 3×2 Factorial in RCBD (Factorial in Randomized Completely Block Design) วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

3.4.3 การปรุงแต่งกลิ่นสุรากลั่นด้วยผิวส้มสายน้ำผึ้ง

3.4.3.1 ศึกษาองค์ประกอบของกลิ่นในสารสกัดจากผิวส้มสายน้ำผึ้ง โดยทำการสกัดสารสกัดจากผิวส้มสายน้ำผึ้ง ด้วยวิธี solvent extraction โดยใช้ปิโตรเลียมอีเทอร์เป็นตัวทำละลาย (ดวงนภา, 2548) เริ่มจากการนำผิวส้มสายน้ำผึ้งมาปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นไฟฟ้า จากนั้นนำปิโตรเลียมอีเทอร์มาเทใส่และผสมให้เข้ากันกับผิวส้ม นำสารละลายที่ได้ไประเหยเอาปิโตรเลียมอีเทอร์ออก ด้วยเครื่อง evaporator วิเคราะห์หาองค์ประกอบของสารกลิ่นด้วยเทคนิค Gas Chromatography-Mass Spectrometry

3.4.3.2 ศึกษาการปรุงแต่งกลิ่นสุรากลั่นด้วยผิวส้มสายน้ำผึ้ง โดยใช้ผิวส้มที่แตกต่างกัน 2 ปัจจัย คือ ปัจจัยแรกเป็นลักษณะการเคลือบไขผิวส้ม ระหว่างส้มที่ผ่านการเคลือบผิวและไม่ผ่านการเคลือบผิว ส่วนปัจจัยที่ 2 คือ ลักษณะการเก็บรักษาผิวส้ม ระหว่างผิวส้มที่ผ่านการแช่แข็งและไม่ผ่านการแช่แข็ง (ใช้ผิวส้มที่ผ่านการแช่แข็งเป็นเวลา 2 สัปดาห์) ทำการแช่ผิวส้มที่หั่นเป็นฝอยกับสุรากลั่นที่ได้คัดเลือกจากตอนที่ 3.4.2 ในปริมาณร้อยละ 15 (w/v) ของปริมาณน้ำสุรา เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมากลั่นอีกครั้งเพื่อให้ได้กลิ่นส้ม และเมื่อปริมาณของแอลกอฮอล์ได้ร้อยละ 60 (v/v) จึงหยุดกลั่น หลังจากนั้นปรับปริมาณแอลกอฮอล์ให้เป็นร้อยละ 40 (v/v) (สุพรรณษา, 2548) วางแผนการทดลองแบบ 2×2 Factorial in CRD (Factorial in Completely Randomized Design) วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) นำผลผลิตที่ได้ไปตรวจสอบคุณภาพด้านต่างๆ โดยทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ได้แก่

- ปริมาณกรดทั้งหมด (กรดแอสซิติค; กรัมต่อลิตร) โดยการไทเทรต (AOAC, 2000)
- ค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้ pH meter (AOAC, 2000)
- ปริมาณสารให้กลิ่นหลักในผิวส้ม โดยใช้เทคนิค Gas Chromatography

นำผลผลิตที่ได้มาเปรียบเทียบกลิ่น โดยการทดสอบทางประสาทสัมผัส ด้วยวิธี Ranking Test โดยใช้ผู้ทดสอบจำนวน 25 คน ตรวจสอบคุณภาพด้านกลิ่นส้มในสุราที่ผลิต (ไพโรจน์, 2539)

3.4.4 การเปรียบเทียบคุณภาพของสุรากลั่นจากส้มสายน้ำผึ้งกับผลิตภัณฑ์ทางการค้า

โดยนำสุรากลั่นจากส้มสายน้ำผึ้งที่ผ่านการยอมรับมากที่สุดในตอนที่ 3.4.2.2 ไปเปรียบเทียบกับสุรากลั่นที่ผ่านการกำจัดกลิ่นด้วยถ่านกัมมันต์ที่ได้จากข้อ 3.4.2.1 และสุราแต่งกลิ่นส้มทางการค้าที่มีจำหน่ายในท้องตลาด จำนวน 2 ตัวอย่าง วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design: CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) นำผลผลิตที่ได้ไปตรวจสอบคุณภาพด้านต่างๆ โดยทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ได้แก่

- ปริมาณกรดทั้งหมด (กรดแอสซิติค; กรั่มต่อลิตร) โดยการไทเทรต (AOAC, 2000)
- ค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้ pH meter (AOAC, 2000)
- ปริมาณแอลกอฮอล์ (ร้อยละ v/v) โดยใช้เครื่องวัดแอลกอฮอล์แบบมือถือ (alcohol hand refractometer)

ทำการทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัส โดยใช้ผู้ทดสอบชิมจำนวน 25 คน ให้คะแนนด้วยวิธี Hedonic scaling test 1-9 (1=ไม่ชอบมากที่สุด 9=ชอบมากที่สุด) ทดสอบคุณภาพด้านกลิ่น รสชาติ และการยอมรับรวม วางแผนการทดลองแบบสุ่มบล็อกสมบูรณ์ (Randomized Completely Block Design: RCBD) วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)