

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุอุปกรณ์

วัตถุดิบ

1. เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* จำนวน 8 สายพันธุ์ทางการค้า ได้แก่ CR104 CR105 CR108 CR109 CR110 CR111 CR112 และ CR116 (ภาคผนวก ง.) ซึ่งเป็นเชื้อผง (active dry yeast) ที่มีจำหน่ายทางการค้า
2. ลูกยอ (*Morinda citrifolia* Linn.) จากอำเภอดอกคำใต้ จ.พะเยา
3. น้ำตาลทราย

สารเคมี

1. Citric acid, BDH (food grade)
2. Sodium hydroxide, Merck (commercial grade)
3. Phenolphthalein, BDH (commercial grade)
4. di-ammonium phosphate, BDH (food grade)

อาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์

1. potato dextrose agar (PDA), Himedia
2. potato dextrose broth (PDB), (ภาคผนวก ก.1)
3. total plate count agar (TPCA), Himedia

อุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิตและวิเคราะห์คุณภาพ

1. เครื่องวัดสี (hunter lab) Color Quest II
2. เครื่องวัดความข้นหนืด (viscometer) Brookfield, Model "LV DV-II+"
3. ขวดหาความถ่วงจำเพาะ (pychanometer)
4. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง Mettler-Toledo, Model "AG204"

5. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) Mettler-Toledo, Model "MP 125FK"
6. เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (hand refractometer) Analytik Jena AG
7. ตู้อบ (hot air oven) Heraeus Instrument, Model "T 6200"
8. กระป๋องหาความชื้น (moisture can)
9. เครื่องวัดแอลกอฮอล์ (ebulliometer) Dujardin-Salleron, Paris
10. ถังหมักไวน์ (polyethylene theraphtharate, PET) ความจุ 20 ลิตร
11. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) เชียงใหม่เมคเทค ซิสเต็มจำกัด, Model "SD-DC-09 REV:O"
12. ตู้บ่มอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (incubator) Sheldon manufacturing Inc., Model "1535-2E"
13. ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (incubator) Sheldon manufacturing Inc., Model "1575R"
14. ตู้แช่แข็ง (freezer) Mirage, Model "FZ - 269"
15. สไลด์นับจำนวนเซลล์ (haemocytometer) Boeco, deep 1/10 mm ผลิตในประเทศเยอรมัน
16. เครื่องเขย่าหลอดทดลอง (vortex) Scientific Industrial Inc., Model "G-560E"
17. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง Mettler-Toledo AG, Model "PB 1502-S"
18. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง Mettler-Toledo, Model "AG204"
19. Micropipette (Mettle-Toledo AG)
20. เตาให้ความร้อน (hot plate) Schott Gerate GmbH, Model "SLK1"
21. เครื่องปั่นอาหาร (blender) Hitachi, Model "VA-MILL"
22. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) Scientific Promotion Co., Ltd., Model "AH-30-110"
23. ชุดอุปกรณ์ทดสอบชิมไวน์

การวางแผนการทดลอง

1 ตรวจสอบคุณภาพของน้ำคั้นจากผลยอ

นำผลยอมาทำการคัดเลือกแยกผลยอดิบ (เขียวทั้งผล) และผลยอสุกจัด (สีเขียวอมเหลืองหรือสีน้ำตาลทั้งผล ผลนิ่มมีกลิ่นแรง) ออกไป จากนั้นทำการคัดผลยอที่เหลือโดยการพิจารณาสีผิวของผลยอเพื่อแบ่งความสุกออกเป็น 3 ระดับ ตามสัดส่วนของสีผิว ซึ่งผิวที่มีสีเขียวอมเหลืองช่วง 0 – 30% จัดเป็นผลยอแก่จัด ผิวสีเขียวอมเหลืองช่วง 30 – 70% จัดเป็นผลยอห่าม และผิวสีเขียวอมเหลืองช่วง 70 – 100% จัดเป็นผลยอสุก จากนั้นนำไปล้างด้วยน้ำสะอาด เก็บใส่ถุงแยกตามระยะความสุก เก็บในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส เมื่อจะทำการทดลองจึงแบ่งมาใช้ โดยหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วเติมน้ำในอัตราส่วน 1 : 1 (โดยน้ำหนัก) บั่นด้วยเครื่องปั่น แล้วกรองด้วยผ้าขาวบางจากนั้นนำน้ำคั้นผลยอที่กรองได้มาศึกษาคุณภาพต่างๆ ดังนี้

1.1 คุณภาพทางกายภาพ ได้แก่

- 1) สี (L a*b*) โดยเครื่องวัดสี Hunter lab (AOAC, 1995)
- 2) ความข้นหนืด (mPas/sec) โดยใช้ Brookfield Viscometer
- 3) ความถ่วงจำเพาะ (specific gravity) โดยการวัดด้วย pynchanometer (AOAC, 1995)

1.2 ศึกษาคุณภาพทางเคมี

- 1) ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ตรวจวัด โดยเครื่อง pH meter (AOAC, 1995)
- 2) ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (total soluble solid) (°Brix) โดยใช้ hand refractometer
- 3) กรดทั้งหมด (total acidity) โดยวิธีการไตเตรทกับ NaOH 0.1 N
- 4) ปริมาณของแข็งทั้งหมด (total solid) โดยการอบใน moisture can ที่ 105 °C เป็นนาน 3 ชั่วโมงหรือจนกว่าน้ำหนักจะคงที่

1.3 คุณภาพทางด้านจุลินทรีย์ ได้แก่

- 1) หาปริมาณแบคทีเรียในน้ำคั้นผลยอในอาหาร plate count agar (ภาคผนวก ก.1) ด้วยวิธี Pour plate แล้วบ่มในตู้บ่มเชื้อ (incubator) ที่อุณหภูมิ 37 °C 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญต่อมิลลิลิตร (Harrigan and McCane, 1966; สุกมาศ, 2544)
- 2) หาปริมาณเชื้อราและยีสต์ในน้ำคั้นผลยอในอาหาร potato dextrose broth ด้วยวิธี pour plate แล้วบ่มในตู้บ่มเชื้อ (incubator) ที่อุณหภูมิ 30 °C 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เจริญต่อมิลลิลิตร (Harrigan and McCane, 1966 ; สุกมาศ, 2544)

วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) วิเคราะห์อย่างละ 3 ซ้ำ ทำวิเคราะห์วาเรียนซ์และทดสอบความแตกต่างโดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

2 ศึกษาผลของน้ำคั้นผลต่อการเจริญของยีสต์ทำไวน์สายพันธุ์ *S. cerevisiae*

เตรียมหัวเชื้อยีสต์โดยการเลี้ยงในอาหาร potato dextrose broth จำนวน 400 มิลลิลิตรต่อชนิด โดยทำการเติมยีสต์ผง 1 กรัมต่อลิตรจากเชื้อยีสต์ 8 สายพันธุ์ทางการค้าได้แก่ CR104 CR105 CR108 CR109 CR110 CR111 CR112 และ CR116 แล้วทำการเขย่าในตู้บ่มอุณหภูมิ 30 °C ความเร็วระดับช้า เป็นเวลา 6 ชั่วโมงก่อนการนำไปใช้

ใช้น้ำคั้นผลยอห่ามผสมกับ potato dextrose broth ในอัตราส่วนแตกต่างกัน 6 ระดับคือ 0:1 1:5 1:10 1:20 1:30 และ 1:40 โดยปริมาตร จำนวนอย่างละ 400 มิลลิลิตรต่อพลาสติก เติมหิวเชื้อยีสต์ที่เตรียมไว้ข้างต้น จำนวนเชื้อละ 1 มิลลิลิตรเชื้อละ 3 พลาสติกด้วยวิธีปลอดเชื้อ ลงในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตรซึ่งมีอาหารอยู่ 400 มิลลิลิตร ทำอย่างละ 3 ซ้ำ แล้วนำไปเขย่าในตู้บ่มเชื้อ ที่อุณหภูมิ 30 °C ตรวจสอบจำนวนยีสต์ทุก 2 วัน เป็นเวลา 6 วัน โดยใช้ haemocytometer ทำการหาค่าเฉลี่ยของผลการทดลองที่ได้นำมาทำกราฟเพื่อหาสายพันธุ์ยีสต์และความเข้มข้นของน้ำคั้นผลยอที่เหมาะสมในการเจริญ

3 ศึกษาผลของการให้ความร้อนแก่น้ำคั้นผลต่อการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae*

เตรียมน้ำคั้นผลยอผสม potato dextrose broth ซึ่งเป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองตอนที่ 2 แบ่งใส่พลาสติก จำนวนพลาสติกละ 400 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปให้ความร้อน 2 ระดับ เติมหิวเชื้อยีสต์ที่ได้จากการเตรียมเช่นเดียวกับวิธีการตั้งการทดลองที่ 2 และใช้สายพันธุ์ที่ได้จากการทดลองที่ 2 เติมลงไปจำนวน 1 มิลลิลิตรต่อพลาสติกโดยทำการทดลองอย่างละ 3 ซ้ำ แล้วนำไปเขย่าในตู้บ่มเชื้อโดยใช้ความเร็วในการเขย่าระดับช้า ที่อุณหภูมิ 30 °C ตรวจสอบจำนวนยีสต์ทุก 2 วัน เป็นเวลา 6 วัน โดยใช้ haemocytometer ทำการหาค่าเฉลี่ยของผลการทดลองที่ได้นำมาทำกราฟเพื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงในอาหารที่ไม่ผ่านการให้ความร้อน

4 ศึกษาผลความสูงแก่ของผลต่อการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae*

เตรียมน้ำคั้นผลยอที่มี potato dextrose broth เป็นส่วนผสมที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองที่ 2 โดยใช้ผลยอสุก 3 ระดับโดยแยกตามวิธีการทดลองที่ 1 จำนวนพลาสติกละ 400 มิลลิลิตร แล้วนำมาผ่านความร้อนในระดับที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองที่ 3 เติมหิวเชื้อยีสต์ที่ได้จากการเตรียมดังวิธีในการทดลองที่ 2 และสายพันธุ์ยีสต์ที่ได้จากการทดลองที่ 2 ใส่ลงในพลาสติก จำนวน

พลาสติก 1 มิลลิเมตรต่อพลาสติก โดยทำการทดลองอย่างละ 3 ซ้ำ แล้วนำไปแช่ในตู้บ่มเชื้อโดยใช้ความเร็วในการเขย่าระดับช้า ที่อุณหภูมิ 30 °C ตรวจสอบจำนวนยีสต์ทุก 2 วัน เป็นเวลา 6 วันโดยใช้ haemocytometer ทำการหาค่าสารละลาย methylene blue ความเข้มข้น 0.1 % ลงบนแผ่นสไลด์เพื่อแยกความแตกต่างระหว่างเซลล์มีชีวิตและเซลล์ไม่มีชีวิต นำข้อมูลมาวิเคราะห์โดยการหาค่าเฉลี่ยของผลการทดลองที่ได้นำมาทำกราฟเพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการเจริญได้ในอาหารที่มีความสูงแก่ของผลยังไม่เท่ากัน

5 ศึกษาปริมาณของ di-ammonium phosphate (DAP) ที่มีผลต่อความสามารถในการหมักไวน์ของ ยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae*

เตรียมน้ำหมักไวน์ถึง 18 ลิตร โดยใช้น้ำคั้นผลยอที่ระดับความสุกที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองที่ 4 เจือจางน้ำคั้นผลยอต่อน้ำอัตราส่วนที่เหมาะสมแทน potato dextrose broth เติมน้ำตาลเพื่อปรับให้มีความหวานเป็น 23 °Brix ความเป็นกรดค่า 4.0 ทำการเติม DAP 5 ระดับคือ 0 300 600 900 1200 ส่วนในล้านส่วน อย่างละ 3 ถัง แล้วนำไปผ่านความร้อนที่ได้จากการทดลองที่ 3 เมื่ออุณหภูมิลดลงที่อุณหภูมิห้อง เติมหิวเชื้อยีสต์ที่เตรียมตามวิธีที่ได้จากการทดลองที่ 2 ปิดฝาด้วยแอร์ล็อก แล้วปล่อยให้หมักในอุณหภูมิห้อง (30 °C) สุ่มตัวอย่างออกมาตรวจสอบคุณภาพในช่วง 21 วันแรกตรวจทุกๆ 3 วัน หลังจากนั้นตรวจทุกๆ 5 วัน ไปจนถึงกระบวนการหมักสิ้นสุดลงโดยทำการวิเคราะห์คุณภาพดังนี้

1. ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ตรวจวัดโดยเครื่อง pH meter (AOAC, 1995)
2. ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (total soluble solid) °Brix โดยใช้ hand refractometer
3. กรดทั้งหมด (total acidity) โดยวิธีการไตเตรทกับ NaOH 0.1 N
4. ปริมาณแอลกอฮอล์ (%v/v) ตรวจโดยใช้ ebulliometer

เมื่อกระบวนการหมักสิ้นสุดลงดูเอาเฉพาะส่วนใสปล่อยให้ไวให้ตกตะกอนอีก 2 สัปดาห์ แล้วดูเอาเฉพาะส่วนใสมาตรวจสอบคุณภาพเช่นเดียวกับข้างต้นแล้วทำการวัดปริมาณกรดระเหยได้ (volatile acidity) เพิ่มเติมหลังจากนั้นนำมาทดสอบประสาทสัมผัส (sensory evaluation) ของไวน์ยอโดยใช้ผู้ทดสอบชิมที่ผ่านการฝึกฝนจำนวน 24 คน โดยทำการวิเคราะห์คุณภาพประสาทสัมผัสในเรื่อง ความใส สี ความซับซ้อนของกลิ่น รสชาติ ความเป็นกรด ขอบกพร่อง คุณภาพทั่วไป ในแต่ละคุณภาพมีการกำหนดคะแนนตามวิธีของ Yair (1996) โดยมีการให้คะแนน 5 – 0 จากชอบมากถึงไม่ชอบมากตามลำดับ แล้วทำการประเมินคุณภาพจากคะแนนที่ได้ ควบกับน้ำหนักของแต่ละคุณภาพ (Yair, 1996) ซึ่งเมื่อรวมกันได้คะแนนเต็ม 100 คะแนน และนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS โดยใช้วิธีการวิเคราะห์วาเรียนซ์ และทดสอบความแตกต่างโดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)