

บทที่ 3

การทดลอง

วัตถุประสงค์ในการผลิตไวน์หม่อน

1. ผลหม่อน (*Morus alba* L.) ได้รับความอนุเคราะห์จากงานหม่อนไหม สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล ผลหม่อนที่ใช้ในการศึกษาคือพันธุ์จีนผลสุก ที่ผ่านการแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ $-25 \pm (-2) ^\circ\text{C}$ ก่อนนำมาละลายน้ำแข็งที่อุณหภูมิห้อง ($27-32 ^\circ\text{C}$)

- | | |
|---|--------------------|
| 2. diammonium hydrogen phosphate (DAP) | A.R. grade (Merck) |
| 3. citric acid | Food grade |
| 4. potassium metabisulfite | Food grade |
| 5. potassium sorbate | Food grade |
| 6. ascorbic acid | Food grade |
| 7. น้ำตาลทรายบริสุทธิ์ (pure refined sugar) | มิตรผล |

สารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมดและกรดระเหย ตามวิธีของ

A.O.A.C.(1995)

- | | |
|--------------------------------|-----------------------------|
| - sodium hydroxide | A.R. grade (Merck) |
| - phenolphthalein | A.R. grade (Riedel-de Haen) |
| - hydrogen peroxide | A.R. grade (Carlo Erba) |
| - potassium hydrogen phthalate | A.R. grade (Merck) |

2. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีของ Shaffer & Somogyi

(A.O.A.C.,1995)

- | | |
|-----------------------------|-------------------------|
| - potassium sodium tartrate | A.R. grade (J.T. Baker) |
| - sodium carbonate | A.R. grade (Merck) |
| - copper sulfate | A.R. grade (Merck) |
| - sodium hydrogen carbonate | A.R. grade (Merck) |
| - potassium iodate | A.R. grade (Carlo Erba) |

- potassium iodide A.R. grade (J.T. Baker)
- sodium thiosulfate A.R. grade (Merck)
- glucose A.R. grade (Merck)
- starch A.R. grade (BDH)
- sulfuric acid A.R. grade (Merck)
- potassium oxalate A.R. grade (J.T. Baker)

3. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ตามวิธี aspiration

(Patrick et al., 1993)

- phosphoric acid A.R. grade (J.T. Baker)
- hydrogen peroxide A.R. grade (J.T. Baker)
- methylene blue A.R. grade (Merck)
- methyl red A.R. grade (Merck)
- potassium hydrogen phthalate A.R. grade (Merck)

4. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ตามวิธีของ A.O.A.C.(1995)

- sulfuric acid A.R. grade (Merck)
- boric acid A.R. grade (Merck)
- sodium hydroxide A.R. grade (Merck)
- ethyl alcohol A.R. grade (J.T. Baker)
- bromocresol green A.R. grade (J.T. Baker)
- methyl red A.R. grade (Merck)
- sodium sulfate A.R. grade (Carlo Erba)
- copper sulfate A.R. grade (Merck)

5. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิต ตามวิธีของ Sharf (1966)

- Potato Dextrose Agar (PDA) Merck

6. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ตามวิธีของ

A.O.A.C.(1995)

- sodium chloride A.R. grade (Merck)
- sodium hydrogen carbonate A.R. grade (Merck)
- methyl orange A.R. grade (Merck)
- hydrochloric acid A.R. grade (Merck)

เชื้อยีสต์

เชื้อยีสต์สำหรับหมักไวน์หม่อน *Saccharomyces cerevisiae* ใช้ในลักษณะผง (active dried yeast) ผลิตโดย Lallemand Australia PTY.Ltd., North Adelaide South Australia มีชื่อทางการค้า Lalvin V-1116 เชื้อยีสต์สำหรับหมักสปาร์คลิงไวน์ (ที่ใช้ทางการค้า) ใช้ในลักษณะผง มี 3 ชนิด โดยชนิดที่ 1 และ 2 *Saccharomyces cerevisiae* ผลิตโดย Maurifoods Yeast Group, Toowoomba Queensland Australia มีชื่อทางการค้า Maurivin PMD และ Maurivin AWRI 796 ตามลำดับ ส่วนเชื้อยีสต์ชนิดที่ 3 *Saccharomyces bayanus* ผลิตโดย Lallemand Australia PTY.Ltd., North Adelaide South Australia มีชื่อทางการค้า Lalvin EC-1118

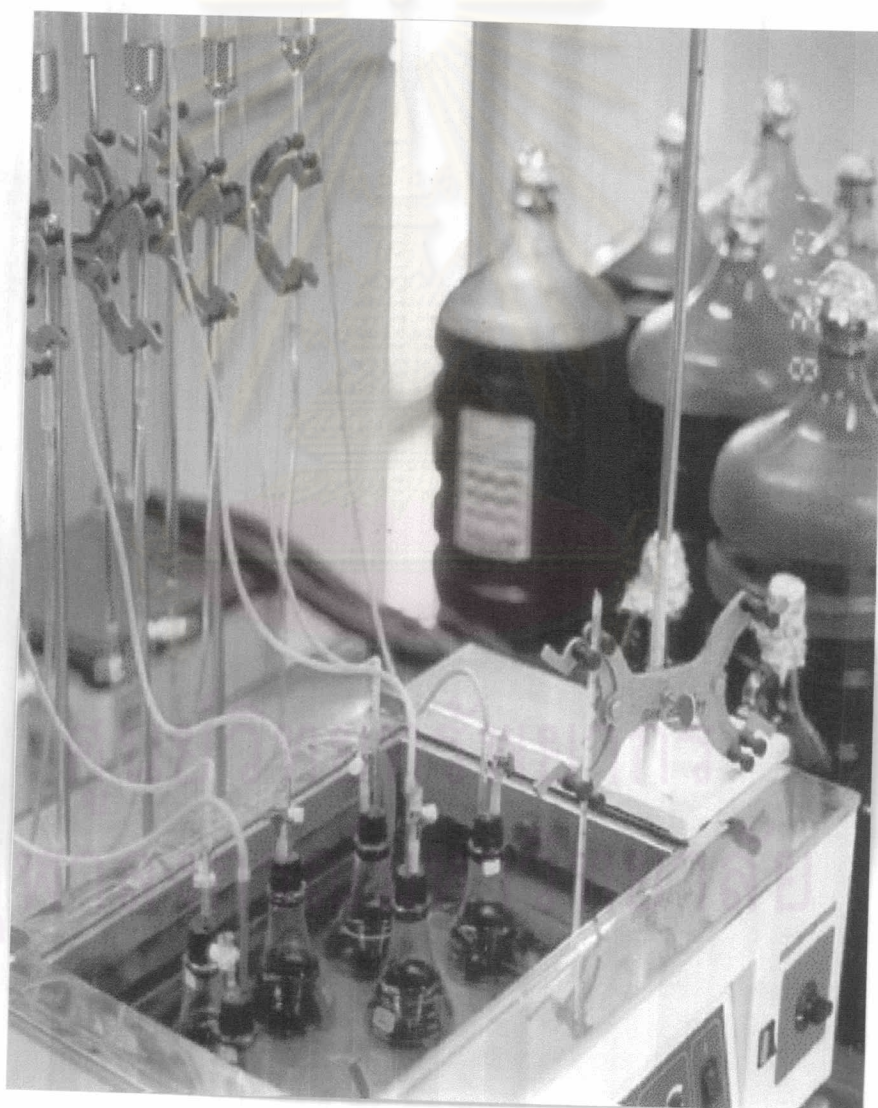
ขั้นตอนการวิจัย

1. การเตรียมไวน์หม่อน เตรียมไวน์หม่อนตามวิธีของ ภัทราภรณ์ ศรีสมรรถการ (2542) โดยใช้ในอัตราส่วนผลหม่อนต่อน้ำสะอาด เท่ากับ 1 ต่อ 3 โดยน้ำหนัก ปรับน้ำตาลให้ได้ 180 กรัม ต่อลิตร ปรับกรดให้ได้ 0.5 % โดยคิดในรูปกรดซิตริก เติม DAP 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และ สูดท้ายเติมยีสต์ Lalvin V-1116 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม หมักที่อุณหภูมิ 25-27 °C นาน 2 สัปดาห์ จากนั้นบ่มไวน์ในถังโพลีเอสเตอร์ (PET) ปากแคบขนาด 20 ลิตรที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 3 เดือน

2. วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของไวน์หม่อนที่เตรียมได้

- ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ หรือ TSS (° Brix) หาโดยใช้ hand refractometer
 - ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ หาโดยใช้วิธีของ Shaffer & Somogyi (A.O.A.C., 1995)
 - ปริมาณกรดทั้งหมดคิดในรูปกรดซิตริกหรือ TA (%w/v) หาตามวิธีของ A.O.A.C. (1995)
 - ปริมาณกรดระเหยคิดในรูปกรดอะซิติก หรือ VA (%w/v) หาตามวิธีของ A.O.A.C. (1995)
 - ปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) โดยวิธี aspiration (Patrick et al., 1993)
 - ความเป็นกรดต่าง (pH) หาโดยใช้ pH meter
 - ปริมาณแอลกอฮอล์ (%v/v) หาโดยใช้ Ebulliometer
- วิเคราะห์จำนวน 3 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ย

3. คัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ที่เหมาะสมในการหมักสปาร์คลิงไวน์หม่อน ติดตั้งอุปกรณ์
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า เครื่องทำความเย็น และชุดวัดปริมาตรแก๊ส CO₂ (ประยุกต์จาก
ชุดวัดปริมาตรแก๊ส CO₂ Chittick apparatus ตามรูปที่ ก.2) โดยปรับอุณหภูมิของน้ำหล่อเย็นไว้ที่
15°C อุณหภูมิห้อง 25-27°C เตรียมสารละลายไวน์หม่อนจำนวน 200 กรัม (ที่หมักและบ่มแล้ว 3
เดือน เติมน้ำตาล 2.5%(w/w) และ DAP 1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ลงในไวน์หม่อน (วัดความ
หนาแน่นของไวน์หม่อนได้ 0.96 กรัมต่อมิลลิลิตร) ใส่ใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ของชุดวัด
ปริมาตรแก๊ส CO₂ ดังรูปที่ 4



รูปที่ 4 ชุดวัดปริมาตรแก๊ส CO₂ และอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า

เตรียมเชื้อยีสต์ที่ใช้ในการหมักสปาร์คลิงไวน์หมอน ได้แก่เชื้อยีสต์ 3 สายพันธุ์ คือ Maurivin PMD, Maurivin AWRI 796 และ Lalvin EC-1118 อายุ 13 ชั่วโมง จำนวน 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (เตรียมโดยเติมสารละลายน้ำตาล 10% w/w (0.5 มิลลิลิตร) ที่อุณหภูมิ 30-35 °C ลงในยีสต์ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทิ้งไว้นาน 1 ชั่วโมง แล้วเติมสารละลายไวน์หมอน : น้ำ (1:1) ที่มีน้ำตาล 5% ปริมาตร 10 เท่าของสารละลายน้ำตาล 10% ที่เติมตอนแรก (4.5 มิลลิลิตร) ทิ้งไว้นาน 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 20 °C) ใส่ในไวน์หมอนที่เตรียมไว้ หมักที่อุณหภูมิ 15°C ตั้งความเร็วรอบของอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าไว้ที่ 100 รอบ/นาที วัดปริมาตรรวมของทีเรจที่เตรียมได้ (มิลลิลิตร) และหาจำนวนเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิตทั้งหมดที่เติมลงไปในทีเรจโดยวิธีของ Sharf (1966)

ติดตามการหมักโดยวัดปริมาตรแก๊ส CO₂ (มิลลิลิตร) ที่เกิดขึ้นจากการหมักของยีสต์ทุก 4 ชั่วโมง วัดการสร้างแก๊สของยีสต์จนกระทั่งยีสต์ไม่สร้างแก๊สเพิ่มขึ้นอีก คำนวณน้ำหนักของ CO₂ (g) ที่เกิดขึ้นจากสมการของ กฎแก๊สสมบูรณ์ $PV = nRT$ (P=แรงดันภายในระบบ(atm), V=ปริมาตรแก๊สภายในระบบ(l), n=mole ของแก๊สในระบบ, R=0.08206 L atm K⁻¹mole⁻¹, K=อุณหภูมิ(K)) นำค่าที่คำนวณได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแก๊ส CO₂(กรัม) กับ เวลา (ชั่วโมง) วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design ทดลอง 3 ซ้ำ

การตรวจสอบลักษณะทางเคมีของไวน์หมอนหลังเสร็จสิ้นการหมักครั้งที่สอง

- ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (° Brix) หาโดยใช้ hand refractometer
 - ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ หาโดยใช้วิธีของ Shaffer & Somogyi (A.O.A.C., 1995)
 - ปริมาณกรดทั้งหมด (คิดในรูปกรดซิตริก) หาตามวิธีของ A.O.A.C. (1995)
 - ความเป็นกรดต่าง (pH) หาโดยใช้ pH meter
 - ปริมาณแอลกอฮอล์ หาโดยใช้ Ebulliometer
- วิเคราะห์จำนวน 3 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. ศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาล ความเข้มข้นของ DAP และความเข้มข้นของยีสต์ที่เหมาะสมในการหมักสปาร์คลิงไวน์หม่อน

ความเข้มข้นของน้ำตาลที่เติม มี 2 ระดับ คือ 1.3 และ 2.5 % (จากการคำนวณปริมาณน้ำตาลที่ต้องใช้เพื่อให้ได้แรงดันภายในขวดเท่ากับ 3.0 และ 6.0 บรรยากาศ ตามลำดับ (Amerine et al., 1967)) ความเข้มข้นของ DAP ที่เติม มี 3 ระดับ คือ 100 300 และ 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (เพื่อใช้เป็นอาหารเสริมสำหรับการเจริญเติบโตของยีสต์ (Graham, 1993)) และความเข้มข้นของยีสต์ที่เติม มี 2 ระดับ คือ 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม วางแผนการทดลองแบบ 2X3X2 factorial in CRD ทดลอง 2 ซ้ำ โดยใช้เชื้อยีสต์ที่ผ่านเกณฑ์ตามข้อ 3 มาหมักแบบหมักในขวด ภายในขวดทนความดันสูง (ขวดที่เลือกใช้เป็นขวดสปาร์คลิงไวน์ที่ผ่านการใช้งานแล้ว นำมาล้าง โดยเลือกขวดที่มีขนาดใกล้เคียงกัน และไม่มีรอยร้าว) ปิดจุกคอขวด ต่อบาล์ว และพันลวด(เพื่อป้องกันไม่ให้จุกคอขวดถูกดันออกมา เนื่องจากแรงดันภายในขวดที่เพิ่มขึ้น) ดังรูปที่ 5 หมักที่อุณหภูมิค่าประมาณ 15 °C โดยวางขวดในแนวนอน



รูปที่ 5 ชุดทดสอบการหมักแบบหมักในขวด และการพันลวด

วัดแรงดันที่เกิดขึ้นโดยใช้มาตรวัดแรงดัน (ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) ดังรูปที่ 6 ทุกๆ 7 วัน จนกว่าแรงดันภายในขวดจะคงที่ สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างแรงดันที่เกิดขึ้น (ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) กับเวลา (วัน)



รูปที่ 6 การวัดแรงดันภายในขวดโดยใช้มาตรวัดแรงดัน (ปอนด์ต่อตารางนิ้ว)

การตรวจสอบลักษณะทางเคมีของไวน์หม่อนหลังเสร็จสิ้นการหมักแบบหมักในขวด

- ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ ($^{\circ}$ Brix) หาโดยใช้ hand refractometer
- ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ หาโดยใช้วิธีของ Shaffer & Somogyi (A.O.A.C., 1995)
- ปริมาณกรดทั้งหมด (คิดในรูปกรดซิตริก) หาตามวิธีของ A.O.A.C. (1995)
- ความเป็นกรดต่าง (pH) หาโดยใช้ pH meter
- ปริมาณแอลกอฮอล์ หาโดยใช้ Ebuliometer

วิเคราะห์จำนวน 3 ซ้ำแล้วหาค่าเฉลี่ย

เลือกสปาร์คลิงไวน์ที่หมักได้มาทดสอบทางประสาทสัมผัส โดยพิจารณาจากเกณฑ์ต่างๆตามลำดับดังนี้

- มีแรงดันภายในขวดสูงสุดในแต่ละความเข้มข้นของน้ำตาลที่ใช้
- มีปริมาณน้ำตาลเหลือน้อยที่สุดในแต่ละความเข้มข้นของน้ำตาลที่ใช้
- มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเหลือน้อยที่สุดในแต่ละความเข้มข้นของน้ำตาลที่ใช้
- ใช้ความเข้มข้นของยีสต์ต่ำที่สุดในแต่ละความเข้มข้นของน้ำตาลที่ใช้

นำสปาร์คลิงไวน์ที่ผ่านเกณฑ์ต่างๆมาทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัส โดยผู้ทดสอบชิมจำนวน 10 คน ที่ผ่านการฝึกฝนให้รู้จักและคุ้นเคยกับสปาร์คลิงไวน์ โดยอธิบายคุณสมบัติของสปาร์คลิงไวน์ ประกอบกับชิมสปาร์คลิงไวน์ที่มีจำหน่ายในท้องตลาด (Pool and Henick-Kling, 1989) วิจัยคุณภาพเปรียบเทียบกับคุณสมบัติของสปาร์คลิงไวน์ที่ควรจะเป็น เพื่อเข้าใจลักษณะทางด้านประสาทสัมผัสต่างๆ ให้ตรงกัน อันได้แก่ ลักษณะของฟองแก๊สที่อยู่ด้านบน ความต่อเนื่องของการมีฟองแก๊ส การเกิดฟองแก๊ส สีและความใส ความรู้สึกที่ได้รับจากการสูดดม ความพึงพอใจเมื่อได้ชิมครั้งแรก การปลดปล่อยของฟองแก๊สภายในปาก ความสมดุลระหว่างกรดและน้ำตาล กลิ่นและรสชาติที่ยังหลงเหลือค้างในปาก และความพึงพอใจโดยรวม จากนั้นให้ผู้ทดสอบชิมสปาร์คลิงไวน์หม่อนและให้ข้อคิดเห็นเกี่ยวกับลักษณะทางประสาทสัมผัสต่างๆ ตามแบบฟอร์มในภาคผนวก ข

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย