



วัตถุดิบ

1. เชื้อยีสต์ เป็นเชื้อยีสต์ผงสำเร็จรูป (active dry wine yeast) ของ Universal Foods Corporation Milwaukee, Wisconsin 5320 USA จำนวน 3 สายพันธุ์คือ Montrachet, Pasteur Champagne และ Epernay 2 (ภาคผนวก ข) นำเชื้อยีสต์ผงสำเร็จรูปมาทำให้กระจายตัวในน้ำเกลือ 0.8 % แล้วทำ spread plate ทดสอบ การปนเปื้อน เลือกโคโลนีที่ตีเก็บบน PDA slant เป็น stock culture เมื่อจะทำการหมัก แต่ละครั้ง จะทำการต่อเชื้อจาก stock culture ทุกครั้งเพื่อลดโอกาสการฆ่าเหล่า

2. น้ำผึ้งที่ใช้มี 4 ชนิดคือ น้ำผึ้งจากดอกสาบเสือ (snake root, Eupatorium odoratum Linn.) น้ำผึ้งจากดอกนุ่น (kapok, Bombax ceiba Linn.) น้ำผึ้งจากดอกลิ้นจี่ (litchi, Litchi chinensis Sonn.) และน้ำผึ้งจากดอกลำไย (longan, Dimocarpus longan Lour.) เก็บที่อุณหภูมิ 20+1 องศาเซลเซียส โดยได้รับความอนุเคราะห์จาก ศาสตราจารย์ ดร. สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ หัวหน้าหน่วยวิจัยผึ้ง ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- |                                    |            |
|------------------------------------|------------|
| 3. Ammonium Sulphate               | A.R. grade |
| 4. Diammonium Hydrogen Phosphate   | A.R. grade |
| 5. Citric acid monohydrate         | Food grade |
| 6. Tartaric acid monohydrate       | Food grade |
| 7. Potassium metabisulphite        | Food grade |
| 8. ผงกรองไวน์ (Diatomaceous earth) | Food grade |

สารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณกรดที่ไตเตรตได้  
Standard sodium hydroxide 0.1 N                      A.R. grade
2. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์  
Sodium hydroxide    A.R. grade  
Sodium potassium tartate                                      A.R. grade  
Glucose    A.R. grade  
Methylene blue    A.R. grade

อาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์

1. Potato Dextrose Agar                                      Difco

อุปกรณ์ในการเตรียมและวิเคราะห์คุณภาพไวน์น้ำผึ้ง

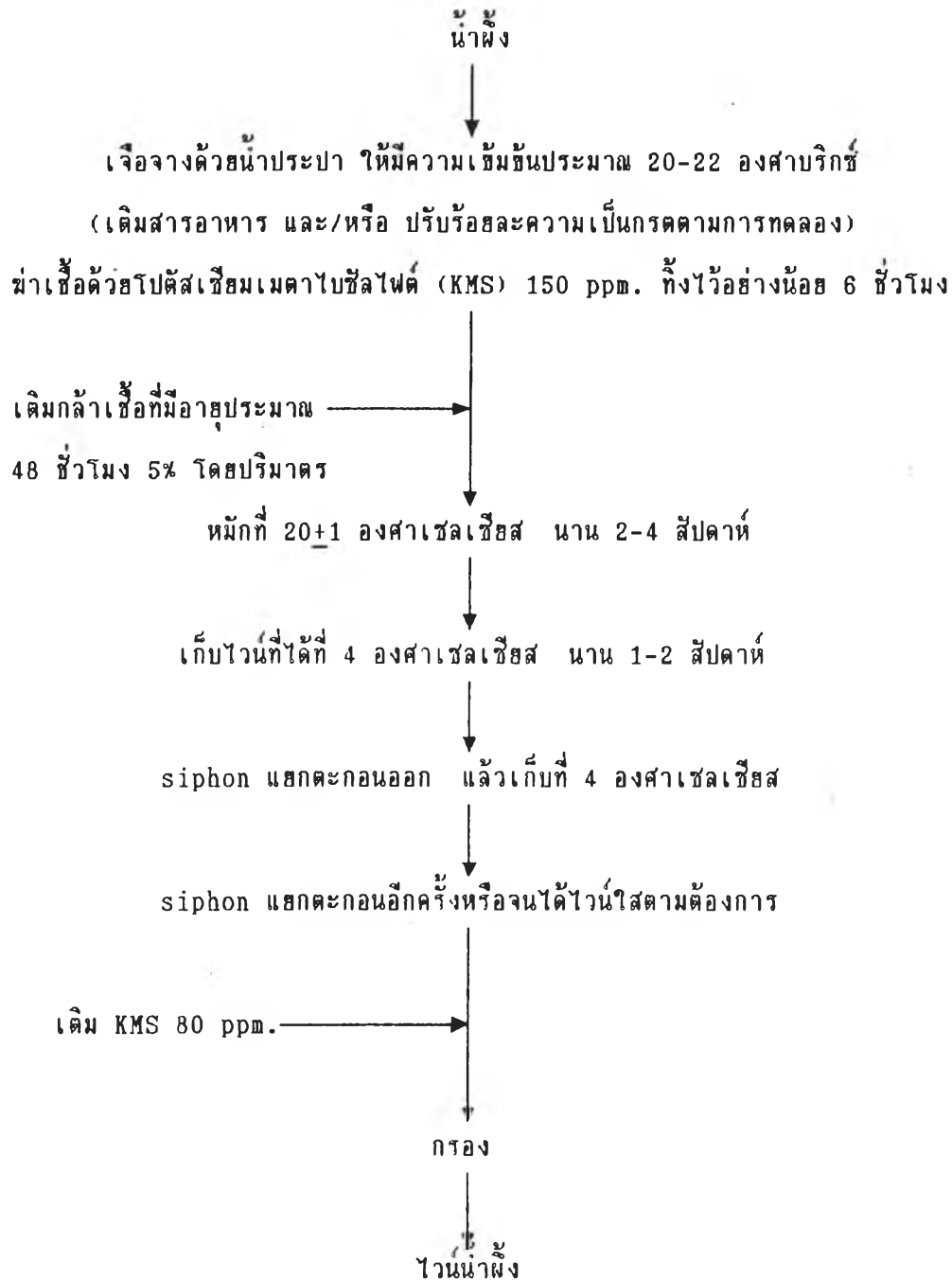
1. pH meter (Schott Gerate, CG 822)
2. ไฮโดรมิเตอร์สำหรับวัดน้ำตาล 3 ช่วงคือ 0-10, 10-20, 20-30 องศาบริกซ์
3. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Tomy, SS-320)
4. เครื่องชั่งทาบ (Sartorius, B3100S)
5. เครื่องชั่งละเอียด (Sartorius, A200S)

การเตรียมกล้าเชื้อ: เตรียมสารละลายน้ำผึ้งเข้มข้น 20 องศาบริกซ์ อาจเติมสารอาหาร และ/หรือ ปรับร้อยละความเป็นกรดตามการทดลอง ปริมาณที่เตรียม เท่ากับร้อยละ 5 ของปริมาณน้ำหมักทั้งหมด นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศา เซลเซียส 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เติมเชื้อยีสต์ 1 loop ต่ออาหาร สำหรับกล้าเชื้อปริมาณ 200 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 48 ชั่วโมง จึงนำมาใช้

การเตรียมน้ำหมัก: เตรียมสารละลายน้ำผึ้งเข้มข้น 20 องศาบริกซ์ อาจเติมสารอาหาร และ/หรือ ปรับร้อยละความเป็นกรดตามการทดลอง ฆ่าเชื้อด้วยโบตัส เซียมเมตาไบซิลไฟต์ (KMS) 150 ppm. ( $\text{SO}_2$  75 ppm.) ทิ้งไว้ อย่างน้อย 6 ชั่วโมงจึงนำมาใช้

กระบวนการผลิตไวน์น้ำผึ้ง (Morse, 1980)

กระบวนการผลิตไวน์น้ำผึ้งที่ใช้ในงานวิจัยมีผังดังรูปที่ 3.1 นี้



รูปที่ 3.1 ผังการผลิตไวน์น้ำผึ้ง

## ขั้นตอนและวิธีการดำเนินการวิจัย

1. วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำผึ้งที่ใช้เป็นวัตถุดิบ  
 นำน้ำผึ้งที่ใช้ทั้ง 4 ชนิดมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ ( $^{\circ}$ Brix) ความชื้น เถ้า ไนโตรเจน น้ำตาลอินเวอร์ตทั้งหมด ฟิเอช ความเป็นกรด (คิดในรูปกรดซัคทริก) ตามวิธีของ AOAC (1990)

## 2. คัดเลือกเชื้อยีสต์ที่เหมาะสมในการหมักไวน์น้ำผึ้ง

### 2.1 คัดเลือกเชื้อยีสต์ที่เหมาะสมในการหมักไวน์น้ำผึ้ง

โดยใช้เชื้อยีสต์ 3 สายพันธุ์คือ

Saccharomyces cerevisiae var. Montrachet

Saccharomyces cerevisiae var. Pasteur Champagne

Saccharomyces cerevisiae var. Epernay 2

น้ำผึ้งที่ใช้คือ น้ำผึ้งสายเสื่อ

เติมสารอาหารได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต [ammonium sulphate,  $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ ] หรือ

ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต [diammonium hydrogen phosphate, DAP,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ]

ร้อยละ 0-0.05 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

### 2.2 การติดตามการหมักโดย (Vine, 1981; Amerine and Ough, 1974)

#### 2.2.1 วัดปริมาณของศาบริกซ์ที่เปลี่ยนแปลงโดยใช้ Hydrometer

#### 2.2.2 วัดปริมาณแอลกอฮอล์ที่เปลี่ยนแปลงโดยใช้ Ebulliometer

(ภาคผนวก ข)

### 2.3 เกณฑ์ที่ใช้ในการคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่เหมาะสมในการหมักไวน์น้ำผึ้ง

#### 2.3.1 การหมักต้องเกิดขึ้นสูงสุดที่อุณหภูมิ $20 \pm 1$ องศาเซลเซียส

และเสร็จสิ้นการหมักในช่วงระยะเวลา 14-21 วัน

เหลือน้ำตาลรีดิวซ์น้อยที่สุด และได้ร้อยละแอลกอฮอล์สูงสุด

#### 2.3.2 ในกรณีที่ประสิทธิภาพในการหมักใกล้เคียงกัน เพิ่มเกณฑ์ตัดสิน

โดยใช้การประเมินผลทางประสาธน์แบบ Numerical Scoring โดยใช้ผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝน 10 คน (Amerine and Singleton, 1972; Meilgarrrd, Civille and Carr, 1990) (ภาคผนวก ก)

วางแผนการทดลองแบบ Symmetric Factorial Design ขนาด 3 x 3 ทดลอง 2 ซ้ำ (Cochran and Cox, 1957)

3. ศึกษาปริมาณสารอาหารที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการหมักไวน์น้ำผึ้ง

3.1 คัดเลือกปริมาณสารอาหารที่เหมาะสมในการหมักไวน์น้ำผึ้งโดยใช้สายพันธุ์เชื้อยีสต์และภาวะที่ได้จากข้อ 2

ปริมาณสารอาหารที่ศึกษา 6 ระดับคือ ร้อยละ 0 0.01 0.03 0.05 0.07 และ 0.09 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร น้ำผึ้งที่ใช้คือ น้ำผึ้งสาบเสือ

3.2 การติดตามการหมัก เช่นเดียวกับข้อ 2.2

3.3 เกณฑ์ที่ใช้ในการคัดเลือกปริมาณสารอาหารที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการหมักไวน์น้ำผึ้ง เช่นเดียวกับข้อ 2.3.1

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design ทดลอง 2 ซ้ำ (Cochran and Cox, 1957)

4. ศึกษาชนิดและปริมาณร้อยละความเป็นกรดที่เหมาะสมสำหรับไวน์น้ำผึ้ง

4.1 คัดเลือกชนิดและปริมาณร้อยละความเป็นกรดที่เหมาะสมในการหมักไวน์น้ำผึ้ง โดยใช้ภาวะที่ได้จากข้อ 3

กรดที่ศึกษา 3 ชนิดคือ กรดซิตริก กรดคาร์ตาริก และกรดซิตริกผสมกรดคาร์ตาริกอัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนัก

ร้อยละความเป็นกรดเริ่มต้นที่ศึกษา 3 ระดับคือ 0.3 0.4 และ 0.5 น้ำผึ้งที่ใช้คือ น้ำผึ้งสาบเสือ

4.2 การติดตามการหมักโดย (Amerine and Ough, 1974; Vine, 1981)

- 4.2.1 วัดปริมาณของสารปริกซ์ที่เปลี่ยนแปลงโดยใช้ Hydrometer
- 4.2.2 วัดปริมาณแอลกอฮอล์ที่เปลี่ยนแปลงโดยใช้ Ebulliometer
- 4.2.3 วัดพีเอชโดยใช้ pH meter
- 4.2.4 วัดปริมาณหรือสละความเป็นกรดที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการหมัก  
โดยใช้การไตเตรทด้วย 0.1 N NaOH
- 4.3 เกณฑ์ที่ใช้ในการตัดสินชนิดและปริมาณหรือสละความเป็นกรดที่เหมาะสมในการหมักไวน์น้ำผึ้ง เช่นเดียวกับข้อ 2.3

วางแผนการทดลองแบบ Symmetric Factorial Design ขนาด 3 x 3  
ทดลอง 2 ซ้ำ (Cochran and Cox, 1957)

5. เปรียบเทียบคุณภาพไวน์ที่ผลิตจากน้ำผึ้งต่างชนิด ที่ผลิตเป็นการค้าในประเทศไทย

- 5.1 นำน้ำผึ้งที่ต้องการศึกษามาผลิตไวน์น้ำผึ้ง โดยใช้ภาวะที่ได้จากข้อ 4  
น้ำผึ้งที่ศึกษามี 4 ชนิดคือ น้ำผึ้งจากดอกสาบเสือ น้ำผึ้งจากดอกนุ่น  
น้ำผึ้งจากดอกลิ้นจี่ และน้ำผึ้งจากดอกลำไย
- 5.2 การติดตามการหมัก เช่นเดียวกับข้อ 2.2
- 5.3 เกณฑ์ที่ใช้ในการตัดสินชนิดน้ำผึ้งในการผลิตไวน์น้ำผึ้ง เช่นเดียวกับข้อ 2.3.1  
และนำไวน์ที่ได้มาประเมินผลทางประสาทสัมผัสแบบ Numerical  
Scoring และ Ranking โดยใช้ผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝน 10 คน  
(Amerine and Singleton, 1972; Meilgaard, Civille and  
Carr, 1990)

วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design ทดลอง  
2 ซ้ำ (Cochran and Cox, 1957)

- 5.4 วิเคราะห์น้ำตาลหลักที่มีในน้ำผึ้ง และไวน์น้ำผึ้งที่ได้ โดยใช้วิธีโครมาโต  
กราฟฟีซันด์เหลวสมรรถนะสูง โดยทำการทดลองที่สภาวะดังนี้  
Column : Phenomenex 10  $\mu$ m -NH<sub>2</sub> bonded phase  
25 cm x 4.6 mm i.d.  
Mobile phase : acetonitrile/water 75:25 (V/V)

Flow rate :  $2 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$

Detector : refractive index

โดยส่งตัวอย่างวิเคราะห์ที่ ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย