

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 เครื่องมือ

3.1.1 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-VIS Spectrophotometer) รุ่น Spekol 1300SA ยี่ห้อ AnalytikJena

3.1.2 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ (Autoclave) รุ่น HA-300 MII ยี่ห้อ Hirayama

3.1.3 เครื่องวัดความหวานน้ำตาล (Refractometer)

3.1.4 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น S20-K ยี่ห้อ Metter

3.1.5 เครื่องวัดปริมาณแอลกอฮอล์ (Ebulliometer) ยี่ห้อ PER VINUM J.SALLERON DUJARDIN PARIS

3.1.6 ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า (Shaking Incubator) รุ่น Sorvall ยี่ห้อ Shel Lab

3.1.7 ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven) รุ่น UM500 ยี่ห้อ Memmert

3.1.8 ตู้เย็น (Refrigerator) รุ่น SBC-3DB ยี่ห้อ Sanyo

3.1.9 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (Balance 2 digital) รุ่น MS 1602S ยี่ห้อ Metter

3.1.10 เตาไฟฟ้า (Hot plate) รุ่นTHS1090 ยี่ห้อ Rommelsbacher

#### 3.2 อุปกรณ์

3.2.1 จานเพาะเชื้อ (Petri dish)

3.2.2 หลอดทดลอง (Test tube)

3.2.3 หลวงถ่ายเชื้อ (Loop)

3.2.4 โถดูดความชื้น (Dessiccator)

3.2.5 บิวเรต (Buret)

3.2.6 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร

3.2.7 ขาตั้งเหล็ก (Stand)

3.2.8 ที่ยึดบิวเรตต์ (Buret clamp)

3.2.9 ปีกเกอร์ (Beaker)

3.2.10 หม้อ (Pot)

3.2.11 เตาแก๊ส (Gas stove)

3.2.12 คิวเวทแก้ว (Glass Cuvette)

3.2.13 ทิป (Tip)

3.2.14 ช้อนตักสาร (Spatula)

3.2.15 กระจกบอทวง (Cylinder) ขนาด 100 และ 1,000 มิลลิลิตร

3.2.16 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol Burner)

3.2.17 กระดาษอลูมิเนียมฟอยล์ (Aluminum foil)

3.2.18 แท่งแก้วคนสาร (Stirring rod)

### 3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารแข็งเอียง YM (Yeast extract-Malt extract Agar Slant) สูตรแสดงดังภาคผนวก ก

### 3.4 สารเคมี

3.4.1 เบนโทไนต์ (bentonite)

3.4.2 แมกนีเซียมซัลเฟต ( $MgSO_4$ )

3.4.3 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $KH_2PO_4$ )

3.4.4 แอมโมเนียมซัลเฟต ( $(NH_4)_2SO_4$ )

3.4.5 โพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ (KMS)

3.4.6 ฟีนอล์ฟทาลีน (phenolphthalein)

3.4.7 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

วิธีการเตรียมสารเคมีดังกล่าวแสดงดังภาคผนวก ก

### 3.5 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5049 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

### 3.6 วิธีการวิจัย

3.6.1 ศึกษาคุณสมบัติของสมุนไพรมะนาว 2 ชนิด คือ มะนาว และขมิ้น

ศึกษาชนิดและปริมาณของสมุนไพรมะนาวที่มีในในพื้นที่ปลูกพันธุ์กรรมพืช แล้วทำการศึกษาคูณสมบัติหรือสรรพคุณของสมุนไพรมะนาวที่สนใจจากหนังสือหรืองานวิจัยต่าง ๆ

3.6.2 การเตรียมวัตถุดิบ

ทำการเก็บสมุนไพรมะนาวในพื้นที่ปลูกพันธุ์กรรมพืช มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ มะนาว และขมิ้น เลือกใบสมุนไพรมะนาวที่มีลักษณะไม่อ่อนหรือแก่จนเกินไป คือ ใบสีเขียวไม่แก่เกินไปและไม่จางเกินไป เส้นใบชัดเจน จากนั้นนำมาล้างน้ำให้สะอาดก่อนอบแล้วล้างทำ

ความสะอาด ผึ่งใบสมุนไพรให้แห้ง จากนั้นนำไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นำไปชั่งน้ำหนักทุกวันจนได้น้ำหนักคงที่ แล้วนำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นโดยวิธี AOAC (1995) ดังสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความชื้น} = \frac{\text{น้ำหนักก่อนอบ} - \text{น้ำหนักหลังอบ}}{\text{น้ำหนักก่อนอบ}} \times 100$$

3.6.3 การผลิตไวน์ (ดัดแปลงวิธีการจาก Trivedi, Rishi and Soni (2012 : 157-166); ปิยะรัชช กุลเมธี, (2552 : 5) ; กรมโรงงานอุตสาหกรรม, (2555 : 1-4) ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

1) การเลี้ยงเชื้อ

ทำการขีดเชื้อ (Streak) *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5049 ลงในอาหารแข็งเยี่ยง YM (YM slant) และเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน

2) การเตรียมกล้าเชื้อ (starter)

นำน้ำสับปรดปริมาณ 75 มิลลิลิตรผสมกับน้ำปริมาณ 75 มิลลิลิตร ใน ฟลาสก์ ขนาด 500 มิลลิลิตร เติมน้ำตาลซูโครสลงไปให้ได้ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (Total Soluble Solids ; TSS) เท่ากับ 20 องศาบริกซ์ ปรับพีเอชโดยใช้แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ให้เท่ากับ 4.5 ปิดด้วยจุกสำลีแล้วนำไปทำให้ปลอดเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 5 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เติมเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5049 ปริมาณ 2 ลูกปกลงไปนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เหย้าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ 620 นาโนเมตร ให้มีค่าเท่ากับ 0.1 ( $1-5 \times 10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร)

3) การเตรียมน้ำสมุนไพร ในงานวิจัยนี้จะผลิตไวน์โดยใช้ใบสมุนไพรสดและแห้ง มีวิธีเตรียมดังต่อไปนี้

เตรียมโดยใช้ใบสมุนไพรสด

คั้นใบสมุนไพรสด 100 กรัมกับน้ำ 2 ลิตร โดยในการปั่นแต่ละครั้งใช้ใบสด 50 กรัม ต่อ น้ำ 1 ลิตร ในการปั่นจะใช้เครื่องปั่น (blender) กรองเอากากออก ปรับปริมาตรให้ได้ 2 ลิตรด้วยน้ำ ปรับปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด เท่ากับ 20 องศาบริกซ์ จากนั้นเติมแมกนีเซียมซัลเฟต ( $MgSO_4$ ) โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $KH_2PO_4$ ) และแอมโมเนียมซัลเฟต ( $(NH_4)_2SO_4$ ) เท่ากับ 0.1, 0.1 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ปรับค่าพีเอช เท่ากับ 4.5 โดยใช้แอมโมเนียม ไฮดรอกไซด์ เติมน้ำโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ (KMS) ปริมาณ 100 ppm ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 คืน

เตรียมโดยใช้ใบสมุนไพรมะเขือ

นำสมุนไพรมะเขือ 10 กรัม มาเติมน้ำ 2 ลิตร ต้มให้เดือดเป็นเวลา 15 นาที กรองเอากากออกปรับปริมาตรให้ได้ 2 ลิตร ปรับปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด เท่ากับ 20 องศาบริกซ์ จากนั้นเติมแมกนีเซียมซัลเฟต ( $MgSO_4$ ) โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $KH_2PO_4$ ) และแอมโมเนียมซัลเฟต ( $(NH_4)_2SO_4$ ) เท่ากับ 0.1, 0.1 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ปรับค่าพีเอช เท่ากับ 4.5 โดยใช้แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์

#### 4) การหมักไวน์สมุนไพรมะเขือ

เติมกล้าเชื้อที่เตรียมไว้ลงไป 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ในน้ำสมุนไพรมะเขือ ปริมาตร 2 ลิตร ที่บรรจุในขวดน้ำดื่มขนาด 5 ลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปิดฝาขวดด้วยจุกสำลี บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 - 14 วัน (ให้มีปริมาณแอลกอฮอล์ไม่เกิน 15 ดีกรี) เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน เพื่อนำมาวิเคราะห์ ปริมาณแอลกอฮอล์ โดยใช้เครื่องวัดปริมาณแอลกอฮอล์ (Ebulliometer) วัดปริมาณกรดโดยการไทเทรต วัดค่า pH ด้วยเครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) และวัดปริมาณปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด โดยใช้รีแฟรกโตมิเตอร์ (Refractometer)

#### 5) การทำให้ไวน์ใส

ทำให้ไวน์ใสโดยการตกตะกอนด้วยสารละลายเบนโทไนต์ (bentonite) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 4 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร)

#### 6) การบ่มไวน์

ทำการบ่มไวน์ในตู้เย็นอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 เดือน

#### 7) การบรรจุไวน์

บรรจุไวน์ลงในขวดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วและปิดฝาขวด

#### 8) การพาสเจอร์ไรส์ไวน์

นำไวน์ไปพาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3.6.4 การประเมินคุณสมบัติด้านประสาทสัมผัสของไวน์สมุนไพรมะเขือ (เจนจิรา ชุมภูคำ และคณะ, 2557)

ทำการประเมินคุณสมบัติด้านประสาทสัมผัสโดยการให้คะแนนความชอบแบบ 5 point hedonic scale มีการให้คะแนนต่ำสุด คือ 1 คะแนน และคะแนน สูงสุด คือ 5 คะแนน โดยพิจารณาในด้านสี ความใส กลิ่น รสชาติ และความชอบโดยรวมของผลิตภัณฑ์ไวน์สมุนไพรมะเขือทั้ง 3 ชนิดโดยมีการให้คะแนนดังนี้ คือ 1 คะแนน คือ ไม่ชอบมาก 2 คะแนน คือ ไม่ชอบ 3 คะแนน คือ ชอบเล็กน้อย

4 คะแนน คือ ชอบปานกลาง 5 คะแนน คือ ชอบมาก จะใช้ผู้ชิมทั่วไปจำนวนไม่น้อยกว่า 50 คน เป็นผู้ให้คะแนนแบบประเมินคุณสมบัติด้านประสาทสัมผัส

### 3.6.5 แผนการทดลอง

ใช้แผนการทดลองแบบ 2x2 Factorial Experimental Design โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ ในผลิตภัณฑ์ไวน์ทุกชนิด รวม 12 Treatment วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม SPSS (Trial Version) ในการตรวจสอบความแตกต่างระหว่าง Treatment โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี