

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 วัตถุดิบ

3.1.1 ฟักข้าว (*Momordica cochichinensis* (Lour.) Spreng)

3.1.2 ฟักเขียว (*Benincasa hispida* (Thunb.) Cogn)

3.1.3 บวบหอม (*Luffa cylindrica* (Linn.) M.J. Roem)

#### 3.2 จุลินทรีย์

*Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5019

#### 3.3 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

3.3.1 หลอดทดลอง (Test tube)

3.3.2 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)

3.3.3 ปิเปตต์ (Pipette)

3.3.4 กระบอกลูกทวง (Cylinder)

3.3.5 ห่วงถ่ายเชื้อ (Loop)

3.3.6 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol burner)

3.3.7 ปีกเกอร์ (Beaker)

3.3.8 หม้อสแตนเลส

3.3.9 น้ำตาล (Sugar)

3.3.10 ถังหมัก (ขวดน้ำดื่มขนาด 6 ลิตร)

3.3.11 น้ำกลั่น (Distilled water)

3.3.12 กรดซิตริก (Citric acid)

3.3.13 แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (Ammonium hydroxide;  $\text{NH}_4\text{OH}$ )

3.3.14 สารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide;  $\text{NaOH}$ )

3.3.15 ฟีนอล์ฟทาลีน (Phenolphthalein)

3.3.16 สารละลายเบนโทไนต์ (Bentonite)

3.3.17 โพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ (Potassium metabisulfite; KMS)

3.3.18 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-VIS Spectrophotometer)

3.3.19 หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)

- 3.3.20 เครื่องวัดความหวานน้ำตาล (Refractometer)
- 3.3.21 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
- 3.3.22 เครื่องวัดปริมาณแอลกอฮอล์ (Ebulliometer)
- 3.3.23 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Shaker incubator)
- 3.3.24 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
- 3.3.25 เครื่องชั่ง (Balance)

### 3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารแข็งวุ้นผิวเอียง YM (Yeast extract-Malt extract Agar Slant)

### 3.5 วิธีการดำเนินงาน

3.5.1 การผลิตไวน์ (ดัดแปลงมาจาก ราณี สุรกาญจน์กุล : 4, 2546 ; ภัทรพงศ์ วงษ์คำสิงห์, 2548 : 3 ;อำพรพรณ ชัยกุลเสรีวัฒน์ และปิยมาศ วงษ์ประยูร, 2549 : 2-3)

#### 1) การเลี้ยงเชื้อ

ทำการขีดเชื้อ (Streak) *S. cerevisiae* TISTR 5019 ลงในอาหารวุ้นผิวเอียง YM (YM slant) และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

#### 2) การเตรียมกล้าเชื้อ (Starter)

ทำการเตรียมกล้าเชื้อในแต่ละการทดลอง จะต้องเติมกล้าเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงไปในน้ำผักปริมาตร 3 ลิตร ดังนั้นจะต้องเตรียมกล้าเชื้อในแต่ละการทดลองเท่ากับ 150 มิลลิลิตร ผู้วิจัยจึงทำการเตรียมกล้าเชื้อในแต่ละการทดลองปริมาตร 200 มิลลิลิตร โดยนำน้ำสับประรดปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำดื่มสะอาดปริมาตร 100 มิลลิลิตร (ปริมาตรต่อปริมาตร) ใส่ในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร เติมน้ำตาลลงไปให้ได้ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (Total Soluble Solids; TSS) เท่ากับ 20 องศาบริกซ์ ปรับพีเอชเท่ากับ 4.5 โดยใช้แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ปิดด้วยจุกสำลีแล้วทำให้ปลอดเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 5 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เติมเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5019 ปริมาณ 2 หลอดไป นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ 620 นาโนเมตร ให้มีค่าเท่ากับ 0.1 ( $1 - 5 \times 10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร)

### 3) การเตรียมน้ำผักจากพืชวงศ์แตง

#### แบบที่ 1 การฆ่าเชื้อโดยวิธีการต้ม

##### ผักเขียว และบวบหอม

นำผักเขียว และบวบหอมที่เตรียมไว้ปอกเปลือก และล้างให้สะอาด หั่นเป็นชิ้น ๆ หรือแผ่นบาง ๆ ปริมาณ 300 กรัม จากนั้นนำมาทำการบดผสมกับน้ำ ด้วยผ้าขาวบางให้ได้ปริมาตร น้ำผัก 3 ลิตร นำน้ำผักเขียว และน้ำบวบหอมที่ได้ไปต้มให้เดือดเป็นเวลา 15 – 20 นาที เติมน้ำตาล ให้มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเท่ากับ 20 องศาบริกซ์ คนให้น้ำตาลละลาย รอให้เย็น กรองผ่านผ้าขาวบางเพื่อแยกเอากากออก ปรับพีเอชให้เท่ากับ 4.5 ด้วยมะนาวก่อนนำไปหมัก จากนั้นบรรจุใส่ขวดโหลขนาด 6 ลิตร

##### ผักข้าว

นำผักข้าวที่เตรียมไว้ คว้านเอาส่วนเยื่อหุ้มเมล็ดสีส้มออกปริมาณ 200 กรัม เติมน้ำ 3 ลิตร นำไปต้มให้เดือดเป็นเวลา 15 – 20 นาที เติมน้ำตาล ให้มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเท่ากับ 20 องศาบริกซ์ คนให้น้ำตาลละลาย กรองด้วยผ้าขาวบางเพื่อแยกกากออก ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น และปรับพีเอชให้เท่ากับ 4.5 ด้วยมะนาวก่อนนำไปหมัก จากนั้นบรรจุใส่ขวดโหลขนาด 6 ลิตร

#### แบบที่ 2 การฆ่าเชื้อโดยวิธีการใช้โพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ (Potassium Metabisulphite ; KMS)

##### ผักเขียว และบวบหอม

นำผักเขียว และบวบหอมที่เตรียมไว้ปอกเปลือก และล้างให้สะอาด หั่นเป็นชิ้น ๆ หรือแผ่นบาง ๆ ปริมาณ 300 กรัม จากนั้นนำมาทำการบดผสมกับน้ำ ด้วยผ้าขาวบางให้ได้ปริมาตร น้ำผักเขียว 3 ลิตร ปริมาตรน้ำผักเขียว และน้ำบวบหอมที่ได้ มาเติมน้ำตาลให้มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเท่ากับ 20 องศาบริกซ์ และปรับพีเอชให้เท่ากับ 4.5 ด้วยมะนาว เติมโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ปริมาณ 100 ppm เพื่อกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมาในน้ำผักเขียว ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนำน้ำผักเขียวที่ได้บรรจุใส่ขวดโหลขนาด 6 ลิตร

##### ผักข้าว

นำผักข้าวที่เตรียมไว้ มาคว้านเยื่อหุ้มออกจากเมล็ดให้ได้ปริมาณ 200 กรัม เติมน้ำ ปริมาตร 3 ลิตร กรองกากหรือเยื่อหุ้มของเมล็ดผักข้าวออกด้วยผ้าขาวบาง จากนั้นเติมน้ำตาลให้ได้ ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเท่ากับ 20 องศาบริกซ์ และปรับพีเอชให้เท่ากับ 4.5 ด้วยมะนาว เติมโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ปริมาณ 100 ppm เพื่อกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมาในน้ำผักข้าว ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนำน้ำผักที่ได้บรรจุใส่ขวดโหลขนาด 6 ลิตร

#### 4) การหมักไวน์พีชวงศ์แดง

เติมกล้าเชื้อที่เตรียมไว้ 5 เปอร์เซ็นต์ ลงในน้ำพักเขียว บวบหอม และพักข้าวที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปิดฝาโหลแก้วด้วยจุกสำลี หมักที่อุณหภูมิห้องไว้เป็นเวลา 7 – 14 วัน (ให้มีปริมาณแอลกอฮอล์ไม่เกินร้อยละ 6 (เนื่องจากไวน์หวานส่วนใหญ่ที่จำหน่ายในบ้านเราปริมาณแอลกอฮอล์อยู่ในช่วงร้อยละ 3-5 เพื่อส่วนที่จะระเหยไปส่วนหนึ่งหลังกระบวนการหมักจึงตรวจสอบให้อยู่ในช่วงร้อยละ 6 ) เก็บตัวอย่างทุก ๆ 2 วัน เพื่อนำมาวิเคราะห์หองค์ประกอบทางเคมี ได้แก่

1. ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ โดยใช้เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำ (Refractometer)
2. ค่าพีเอชโดยใช้เครื่องวัดความเป็นพีเอช (pH meter)
3. วิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมดโดยการไทเทรต (Acid – base titration)
4. ปริมาณแอลกอฮอล์ โดยใช้เครื่อง Ebulliometer

#### 5) การแยกส่วนใส

นำไวน์ที่ได้มารองด้วยผ้าขาวบางเพื่อแยกส่วนของไวน์ออกจากตะกอนหลังการหมักสิ้นสุด หลังจากแยกส่วนใสครั้งแรกแล้วอาจเกิดตะกอนตกอยู่ภายใต้ก้นถังอยู่ ให้ทำการแยกตะกอนใหม่อีกครั้ง หลังจากนั้นทำลายยีสต์ที่หลงเหลือเพื่อหยุดปฏิกิริยาการหมักของยีสต์ โดยใช้สารละลายโพแตสเซียมเมตาไบซัลไฟท์ ในปริมาณ 0.15 – 0.25 กรัมต่อลิตร (ธีรวัลย์ ชาญฤทธิเสน, 2542)

#### 6) การบ่มไวน์

ทำการบ่มไวน์ที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 เดือน

#### 7) การทำให้ไวน์ใส

ทำให้ไวน์ใสโดยการตกตะกอนด้วยสารละลายเบนโทไนต์ (bentonite) ความเข้มข้นร้อยละ 5 (เบนโทไนต์ 5 กรัมต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร) (ขจรศักดิ์ อินทร์ปรง และณรงค์ พัฒร์รักษ์, 2544 : 23) โดยใช้สารละลาย 5 – 20 มิลลิลิตรต่อไวน์ 1 ลิตร ทิ้งไว้ 2 สัปดาห์

#### 8) การบรรจุไวน์

บรรจุไวน์ลงในขวดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วและปิดฝาขวด

#### 9) การพาสเจอร์ไรซ์ไวน์

นำไวน์ไปพาสเจอร์ไรซ์ที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

#### 10) การติดฉลากผลิตภัณฑ์

ออกแบบ ทำการติดฉลากผลิตภัณฑ์ไวน์

#### 11) การเก็บไวน์

เก็บรักษาไวน์ที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการเปลี่ยนแปลง สี กลิ่น และรสชาติ

### 3.5.2 การตรวจสอบลักษณะปรากฏของไวน์

ตรวจสอบลักษณะปรากฏของไวน์ โดยการสังเกตด้วยสายตาของผู้ทำวิจัยและวัดค่าสีด้วยเครื่องวัดสี (chroma meter) ระบบ C.I.E. L\*, a\*, b\*, C\* และ h (สุนันทา และคณะ, 2551: 4)

### 3.5.3 การประเมินคุณภาพด้านประสาทสัมผัสของไวน์พีชวงศ์แดง

ทำการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสด้านสี กลิ่น รส ความใส และความชอบรวมของไวน์พีชวงศ์แดงที่ผลิตได้ โดยใช้ผู้ทดสอบไม่น้อยกว่า 50 คน ให้คะแนนแบบ 5 Point Hedonic Scale มีการให้คะแนนต่ำสุด คือ 1 คะแนนและคะแนนสูงสุด คือ 5 คะแนน ซึ่งมีการให้คะแนนดังนี้ คือ 1 คะแนน หมายถึง ไม่ชอบมาก 2 คะแนน หมายถึง ไม่ชอบเล็กน้อย 3 คะแนน หมายถึง เฉยๆ 4 คะแนน หมายถึง ชอบ และ 5 คะแนน หมายถึง ชอบมาก

### 3.5.4 ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay (ดัดแปลงวิธีการของ ประพนอม สุขแก้ว, 2556 : 20)

### 3.5.5 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD) ศึกษา 2 ปัจจัยที่มีต่อการผลิตไวน์ คือ ปัจจัยที่ 1 พีชวงศ์แดง 3 ชนิด ปัจจัยที่ 2 วิธีการฆ่าเชื้อก่อนการหมัก 2 วิธี และทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของการทดลอง เปรียบเทียบผลทางการประเมินทางด้านประสาทสัมผัส โดยวิธี Duncan's New Multiple Rang Test (DMRT) ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้โปรแกรม SPSS (Trial Version) ในการวิเคราะห์ข้อมูล