บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัตถุดิบ

3.1.1 เปลือกทุเรียนพันธุ์หมอนทอง จากร้านขายทุเรียนแปรรูป ต. เนินสูง อ. ท่าใหม่ จ.จันทบุรี

3.1.2 กระเจี๊ยบแดงตากแห้ง จากตลาดสดน้ำพุ อ. เมือง จ. จันทบุรี

3.2 จุลินทรีย์

Saccharomyces cerevisiae BCC 6127 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

3.3 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

3.3.1 หลอดทดลอง (Test tube)

3.3.2 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)

3.3.3 ปิเปตต์ (Pipette)

3.3.4 กระบอกตวง (Cylinder)

3.3.5 ห่วงถ่ายเชื้อ (Loop)

3.3.6 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol burner)

3.3.7 บีกเกอร์ (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; NH_4OH)

3.3.14 สารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide; NaOH)

3.3.15 ฟีนอล์ฟทาลีน (Phenolphthalein)

3.3.16 สารละลายเบนโทไนต์ (Bentonite)

3.3.17 โพแทสเซียสเมตาไบซัลไฟต์ (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

3.4.1 อาหารแข็ง YM (Yeast extract Malt extract Agar)

3.4.2 อาหารแข็งเอียง YM (Yeast extract Malt extract AgarSlant)

3.4.3 อาหารแข็ง NA (Nutrient agar)

3.4.4 อาหารเหลว YP (Yeast Peptone)

3.4.5 อาหารแข็ง PDA (Potato Dextrose Agar)

3.5 วิธีการดำเนินงาน

3.5.1 วิธีการเตรียมวัตถุดิบดัดแปลงจากวิธีการของ Unhasirikul และคณะ (2013)

นำส่วนในของเปลือกทุเรียนมาหั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆ ประมาณ 1-2 เซนติเมตร ชั่งน้ำหนักสด ล้างด้วยน้ำสะอาดเพื่อเอาสิ่งสกปรกออก แล้วทำให้แห้งโดยการนำไปอบในเครื่องอบลมร้อน (Hot air oven) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ชั่งน้ำหนักทุกวันจนกว่าน้ำหนักจะคงที่ หลังจากนั้นนำตัวอย่าง ที่ได้มาบดด้วยเครื่องปั่น (blender) ร่อนผ่านตะแกรงร่อนแป้ง บรรจุใส่ถุงพลาสติกแบบซิปล็อคและเก็บไว้ในกล่องที่มีซิลิกาเจล เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

3.5.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเปลือกทุเรียนอบแห้ง

นำตัวอย่างที่ได้จากข้อ 12.1 ไปวิเคราะห์ปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน เถ้า ไฟเบอร์ และคาร์โบไฮเดรตโดยรวม ตามวิธีของ AOAC (2012)

3.5.3 การสกัดโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนตามวิธีการของ Pongsamart และ Panmaung (1998)

นำเปลือกทุเรียน 1 กิโลกรัมมาผสมกับน้ำ 5 ลิตร ปรับพีเอชด้วยกรดซิตริกให้ได้พีเอช 4.5 นำมาต้มเป็นเวลา 20 นาที กรอง (filter) แล้วเติมกีเซลกัวร์ (Kieselguhr) ปริมาณ 25 กรัม หลังจากนั้นกรองโดยใช้ระบบสูญญากาศ (vacuum filter) อีกครั้งจนกว่าจะใส ทำให้เข้มข้นด้วยเครื่องกลั่นระเหยแบบหมุน (Rotary Evaporator) ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เติมเอทานอลเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ลงไปผสมอย่างช้า ๆ รอจนตกตะกอน นำมากรองผ่านตะแกรงร่อนแป้ง ล้างด้วยเอทานอลเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์

อีก 2 ครั้ง แล้วตามด้วยเอทานอลความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ นำมาอบในเครื่องอบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และนำมาร่อนผ่านตะแกรงอีกครั้ง จะได้ผงโพลีแซคคาไรด์ เพื่อนำไปใช้เป็นวัสดุพยุงในการตรึงเซลล์ต่อไป

3.5.4 การผลิตเซลล์ตรึงโดยใช้โพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียนเป็นวัสดุตรึง

3.5.4.1 การเตรียมกล้าเชื้อ ดัดแปลงจากวิธีของเวสารัช สุนทรชัยบูรณ์ และรัชพล พะวงศ์รัตน์ (2556)

ถ่ายเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* BCC 6127 ที่เพาะเลี้ยงไปเป็นเวลา 3 วัน จำนวน 1 ลูปลงในอาหารเหลว YM ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 120 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ให้มีค่าเท่ากับ 0.1 ($1\text{-}5x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)

3.5.4.2 การผลิตเซลล์ตรึงโดยใช้โพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียน ดัดแปลงจากวิธีการของ ศศิธร คงเรือง และเบญจมาภรณ์ วงศ์อนุ (2550); อารี ฤทธิบูรณ์ และคณะ (2550)

1) นำโพลีแซคคาไรด์ความเข้มข้นต่างๆ ผสมกับโซเดียมอัลจิเนตในอัตราส่วนดังนี้ 100 : 0, 90 : 10, 80 : 20, 70 : 30, 60 : 40, 50 : 50 และ 40 : 60 โดยใช้สารผสม 1 กรัมละลายในกรดซิตริกเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 33.3 มิลลิลิตร ใช้เวลา 3 ชั่วโมง ทิ้งไว้ 1 - 2 วัน จะได้สารละลายหนืดใส ฆ่าเชื้อด้วยเครื่องหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 5 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที

2) ดูดสารละลายจากข้อ 1) ด้วยกระบอกฉีดยาที่ปลอดเชื้อ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลอดเชื้อ ปิเปตต์หัวเชื้อยีสต์ปริมาตร 5 มิลลิลิตรตามลงไปแล้วคนให้เข้ากัน

3) ดูดสารผสมของยีสต์กับโพลีแซคคาไรด์ด้วยกระบอกฉีดยาปลอดเชื้อ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ค่อย ๆ หยดลงในขวดรูปชมพู่ที่ปลอดเชื้อที่บรรจุสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ทีละหยด จำนวน 1 ขวด ทำสามซ้ำ ได้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 3 ขวด ปิดฝา ทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง ในตู้ถ่ายเชื้อ

4) กรองยีสต์ตรึงรูปที่อยู่ในรูปเม็ดเจลด้วยผ้าขาวบางปลอดเชื้อ เทส่วนสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ทิ้ง ให้เหลือแต่ยีสต์ตรึงรูปไว้ในขวดเดิม นำเซลล์ตรึงที่ได้ส่วนหนึ่งไปผลิตไวน์ อีกส่วนหนึ่งนำมานับจำนวนโคโลนีโดยวิธี Total plate count (TPC) คือนำตัวอย่างเม็ดเจลมาล้างด้วยน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตรแล้วแยกน้ำเกลือออกให้เหลือแต่เม็ดเจล

เติมโซเดียมซิเตรต ($NaCH_3COO$) ความเข้มข้น 0.10 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตรเขย่าด้วยเครื่องผสม (vortex) เป็นเวลา 3 นาที โครงสร้างของโพลีแซคคาไรด์จะถูกทำลายเป็นของเหลว นำตัวอย่างที่ละลายมา 0.10 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่ปลอดเชื้อทำการ pour plate โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ YM บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมานับจำนวนโคโลนี

3.5.5 การผลิตไวน์กระเจี๊ยบดัดแปลงวิธีการจาก Arubi และ Offonry (2009); ปิยะรัชช์ กุลเมธี (2552); กรมโรงงานอุตสาหกรรม (2555); Trivedi และคณะ(2012)

3.5.5.1 การเลี้ยงเชื้อ

ทำการเขี่ยเชื้อ (Streak) *S. cerevisiae* BCC 6127 ในอาหารแข็งเอียง YM บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

3.5.5.2 การเตรียมกล้าเชื้อ (Starter)

ทำการเตรียมกล้าเชื้อปริมาตร 250 มิลลิลิตร โดยนำกระเจี๊ยบ 10 กรัม เติมน้ำ 250 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดนาน 10 นาทีกรองด้วยผ้าขาวบางสะอาด นำน้ำกระเจี๊ยบ 250 มิลลิลิตร ใส่ลงไปในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร และเติมน้ำตาลซูโครสลงไปให้ได้ปริมาณ Total Soluble Solid (TSS) เท่ากับ 20 องศาบริกซ์ ปรับพีเอชให้ได้ 4.50 ด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (NH_4OH) ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ปิดจุกสำลีแล้วนำไปทำให้ปลอดเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 5 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เติมเชื้อ *S. cerevisiae* BCC 6127 ปริมาณ 2 ลูป นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ 720 นาโนเมตร ให้มีค่าเท่ากับ 0.1 ($1\text{-}5 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)

3.6 การเตรียมน้ำกระเจี๊ยบ

นำกระเจี๊ยบมาคัดแยก ล้างน้ำเพื่อขจัดสิ่งสกปรก ต้มกระเจี๊ยบ 240 กรัม ในน้ำ 6 ลิตร ต้มให้เดือดเป็นเวลา 10 นาที กรองด้วยผ้าขาวบางสะอาด ปรับปริมาตรให้ได้ประมาณ 3 ลิตรเติมน้ำตาลซูโครสให้ได้ TSS เท่ากับ 20 องศาบริกซ์ จากนั้นเติมแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) และแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) เท่ากับ 0.01, 0.1 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ปรับค่าพีเอชเท่ากับ 4.5 โดยใช้แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มอลและเติมโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ลงไปปริมาณ 100 พีพีเอ็มทิ้งไว้ 1 คืน

3.7 กระบวนการหมัก

ในการเติมกล้าเชื้อจะทำ 2 วิธี คือ เติมกล้าเชื้ออิสระ โดยนำกล้าเชื้อที่เตรียมไว้ 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) และอีกวิธีหนึ่ง คือ เติมกล้าเชื้อเซลล์ตรึงที่มีจำนวนเซลล์เท่ากับ

เซลล์อิสระในวิธีที่1 ปริมาตร 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) หลังจากนั้นใส่ลงในน้ำกระเจี๊ยบ ปริมาตร 3 ลิตร ที่บรรจุขวดน้ำดื่มขนาด 5 ลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปิดฝาขวดด้วยจุกสำลี บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30-35 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 - 14 วัน ให้มีแอลกอฮอล์อยู่ในช่วง 6 - 14 ดีกรี เก็บตัวอย่างทุก 2 วันเพื่อนำมาวิเคราะห์ค่าต่าง ๆ คือ

1) วัดปริมาณแอลกอฮอล์ โดยใช้เครื่องวัดปริมาณแอลกอฮอล์ (ebulliometer)

2) วัดค่าพีเอชด้วยเครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter)

3) วัดปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ (Total Soluble Solid, TSS) ด้วยเครื่องรีแฟรกโตมิเตอร์ (refractometer)

3.8 การทำให้ไวน์ใส

นำไวน์ที่หมักได้มากรองด้วยผ้าขาวบาง ถ่ายใส่ขวดน้ำดื่ม ขนาด 5 ลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ทำให้ไวน์ใสโดยการตกตะกอนด้วยสารละลายเบนโทไนต์ (bentonite) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 4 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในกรณีเติมกล้าเชื้อเซลล์ตรึง ไม่ต้องเติมสารละลายเบนโทไนท์ (bentonite)

3.9 การบ่มไวน์ จะทำการบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 เดือน

3.10 การบรรจุ จะบรรจุไวน์ลงในขวดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และปิดฝา

3.11 การพาสเจอร์ไรซ์ไวน์ นำไวน์ไปพาสเจอร์ไรซ์ที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3.12 การนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ใหม่

ทำการกรองเม็ดเจลในการหมักครั้งที่ 1 แล้วถ่ายสู่การหมักซ้ำครั้งต่อ ๆ ไป จนกว่าเซลล์ตรึงจะหมดประสิทธิภาพ โดยก่อนการหมักครั้งใหม่ จะต้องล้างด้วยน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง เพื่อกำจัดเซลล์ที่รั่วไหลออกจากเม็ดเจล การหมักจะเติมกล้าเชื้อเซลล์ตรึงที่ที่ล้างด้วยน้ำเกลือแล้วลงในน้ำกระเจี๊ยบปริมาตร 3 ลิตร ที่บรรจุขวดน้ำดื่มขนาด 5 ลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปิดฝาขวดด้วยจุกสำลี บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30-35 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 - 14 วัน ให้มีแอลกอฮอล์อยู่ในช่วง 6 - 14 ดีกรี โดยจะเก็บตัวอย่างทุก 2 วัน เพื่อนำมาวิเคราะห์ค่าต่าง ๆ ดังข้อที่ 12.5.4 หลังจากนั้นจะปฏิบัติการวิธีการข้อ 12.6-12.10 ต่อไป และจะนำเซลล์ตรึงมาหมักซ้ำตามขั้นตอนแบบเดิมจนกระทั่งเซลล์ตรึงหมดประสิทธิภาพในการหมักไวน์

3.13 ตรวจสอบลักษณะปรากฏของไวน์ที่ผลิตได้สุดท้ายโดยการตรวจลักษณะปรากฏ ได้แก่ สี ความใส ความขุ่น โดยใช้สายตา และวัดค่าสีตามระบบ CIE (L*, a*, b*) วัดค่าความสว่าง (L* - value) ค่าเป็นสีเขียว-แดง (a*-value) ค่าเป็นน้ำเงิน-เหลือง (b*-value) และค่าความแตกต่างสีโดยรวม (E) เปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมด้วยเครื่องวัดสี (รุ่น WAV-006, FRU, China)

3.14 นำไวน์ที่ผลิตได้ไปทดสอบคุณสมบัติทางประสาทสัมผัส โดยวิธี 5-point Hedonic Scale โดยใช้ผู้ทดสอบทั่วไปจำนวนไม่น้อยกว่า 50 คน