บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุ

1. วัตถุดิบ

สับปะรดพันธุ์ภูเก็ต (*Ananas comosus (L)Merr*. var. Queen) และปัตตาเวีย (*Ananas comosus (L) Merr*. var. Cayenne) ซื้อจากตลาดผักและผลไม้หาดใหญ่

2. จุลินทรีย์

เชื้อยีสต์บริสุทธิ์จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (หมายเลข 1-3) เชื้อยีสต์บริสุทธิ์จากมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (หมายเลข 4-8) เชื้อยีสต์บริสุทธิ์หมายเลข 9-14 ได้รับการเอื้อเฟื้อจากคุณธนารัตน์ พงษ์เภตรา บริษัททักษิณปาล์ม จำกัด

1. *Saccharomyces cerevisiae* จากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
2. *Saccharomyces cerevisiae* var. burgandy จากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
3. *Saccharomyces cerevisiae* var. montrachet จากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
4. *Saccharomyces cerevisiae* var. sake จากมหาวิทยาลัยเชียงใหม่
5. *Saccharomyces cerevisiae* var. montrachet จากมหาวิทยาลัยเชียงใหม่
6. *Saccharomyces cerev isiae* var. champagne จากมหาวิทยาลัยเชียงใหม่
7. *Saccharomyces cerevisiae* var. burgundy จากมหาวิทยาลัยเชียงใหม่
8. *Saccharomyces cerevisiae* จากมหาวิทยาลัยเชียงใหม่
9. *Saccharomyces cerevisiae* Australia
10. *Saccharomyces cerevisiae* DPA-16P
11. *Saccharomyces cerevisiae* EC-118
12. *Saccharomyces cerevisiae* BDX
13. *Saccharomyces cerevisiae* V-116
14. *Saccharomyces cerevisiae* Versadra

3 เอนไซม์เพคติเนส

Pectinase enzyme Biochemika powder ผลิตจาก *Aspergillus niger* ของบริษัท Fluka EC 3.2.1.15. AR grade #17389 ประกอบด้วย polygalacturonase macerozyme R-10 9032-75-1 MFCD00131809

3. สารเคมี
   3.1. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์
   3.2. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน
   3.3. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด
   3.4. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน
   3.5. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมด
   3.6. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณกรดระเหย
   3.7. สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์เพคติน

อุปกรณ์

1. หม้อนึ่งความดัน
2. เครื่องวัดพีเอช รุ่น model 420 A ของบริษัท ORION จำกัด
3. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น HF-1200G ของบริษัท AND จำกัด
4. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น BP 210S ของบริษัท Satorious จำกัด
5. เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ รุ่น SCR 20 B ของบริษัท Hitchi Koki จำกัด
6. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ รุ่น Model G25-KLG ของบริษัท Scientific Promotion จำกัด
7. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น U-2000 ของบริษัท Hitachi จำกัด
8. เตาเผา รุ่น Vulcan 3-1750 ของบริษัท Ney จำกัด
9. เครื่อง Gas Chromatography/mass spectrometer รุ่น 5890 series 2 ของบริษัท Hewlett Packard จำกัด
10. เครื่อง Gas Chromatography รุ่น 6850 ของบริษัท Hewlett Packard จำกัด
11. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ของบริษัท Memmert จำกัด
12. เตาเผา ร่นุ 550-14 ของบริษัท Fisher Scientific จำกัด
13. Hand refractometer 0-32% ของบริษัท N.O.W Tokyo จำกัด
14. เครื่องวัดความหนืด รุ่น LVDV-I+ ของบริษัท Brookfield จำกัด
15. ตู้บ่มเชื้อ ของบริษัท Memmert จำกัด
16. กล้องจุลทรรศน์ รุ่น YS2-H ของบริษัท Nikon จำกัด
17. เครื่องปั่นน้ำผลไม้ รุ่น MX-T2G ของบริษัท National จำกัด

วิธีการทดลอง

1. **การวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียและภูเก็ต (ภาคผนวก ก)**

1.1. วัดค่าพีเอช โดยใช้เครื่องวัดพีเอช

1.2. วิเคราะห์หากรดทั้งหมด (total acidity) (AOAC, 1990)

1.3. วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยใช้วิธี phenol method (Dubois *et al*., 1956)

1.4. วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้วิธี Somogyi-Nelson method (Nelson, 1944; Somogyi, 1952)

1.5. วิเคราะห์ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ (total soluble solids) โดยใช้ Hand refractometer

1.6. วิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ (Amerine and Ough, 1974 ; AOAC, 1990)

1.7. วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยใช้วิธี Lowry method (Lowry *et al*., 1951)

1.8. วิเคราะห์ปริมาณเพคติน (Shelukhina and Fedichkina, 1994)

1.9. วิเคราะห์ปริมาณความชื้น (A.O.A.C., 1984)

1.10. วิเคราะห์ปริมาณเถ้า (Amerine and Ough, 1980b)

2. **ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มกล้าเชื้อยีสต์ทั้ง 14 สายพันธุ์ในน้ำสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย**

2.1. การเตรียมวัตถุดิบ

เลือกสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียที่มีขนาดและสีของเปลือกใกล้เคียงกัน นำมาล้างให้สะอาด ปอกเปลือกและแกนกลางออกและแยกส่วนที่เน่าเสียออก หั่นสับปะรดตามขวาง นำมาคั้นน้ำและกรองด้วยผ้าขาวบาง เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตรา 1 ต่อ 1 ปรับน้ำสับปะรดให้มี pH เป็น 4 และมีความหวาน 24 °Brix เติมไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (DAP) 0.05% (น้ำหนักต่อปริมาตร) แบ่งน้ำสับปะรดใส่ขวดรูปชมพู่ ที่ฆ่าเชื้อแล้วขนาด 250 มิลลิลิตร ขวดละ 150 มิลลิลิตร ปิดจุกด้วยสำลีแล้วนำมาฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งจนเย็นที่อุณหภูมิห้อง

2.2. การเจริญของเชื้อยีสต์

ถ่ายเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* จำนวน 14 สายพันธุ์ ลงในหลอดอาหารพีดีเอบ่มที่อุณหภูมิห้องให้เชื้อเจริญเต็มที่เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นถ่ายเชื้อยีสต์ 2 ลูป ลงในน้ำสับปะรดที่เตรียมดังข้อ 2.1 เชื้อละ 1 ขวด นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยเก็บตัวอย่างครั้งละ 10 มิลลิลิตร ที่เวลาต่างๆ

กัน นำไปวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตรและ pH เพื่อศึกษาอายุของเซลล์ยีสต์ที่จะนำไปทำกล้าเชื้อในการหมักไวน์สับปะรดต่อไป

3. ศึกษาสายพันธุ์ยีสต์ที่เหมาะสมในการหมักไวน์สับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย

3.1. การเตรียมน้ำสับปะรดที่ใช้หมักไวน์

การเตรียมน้ำสับปะรดที่จะใช้หมักไวน์ตามข้อ 2.1 แต่ไม่ต้องใส่ DAP และไม่ต้องนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ให้ใช้วิธีฆ่าเชื้อที่ปนเปื้อนโดยเติมสารละลายโปแตสเซี่ยมเมตาไบซัลไฟต์ (KMS) ในปริมาณ 200 ส่วนในล้านส่วน บรรจุลงในขวดแก้วที่ใช้หมักไวน์ขนาด 1 ลิตร ปริมาตร 900 มิลลิลิตร ปิดจุกด้วยสำลีสะอาด ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง

3.2. การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์

เตรียมกล้าเชื้อยีสต์ตามการทดลองที่ 2 โดยเลี้ยงเซลล์ยีสต์ที่มีอายุเหมาะสมจากการทดลองข้อ 2 นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง

3.3. การหมักไวน์สับปะรด

หมักน้ำสับปะรดที่ใส่กล้าเชื้อยีสต์ 14 สายพันธุ์ โดยใส่กล้าเชื้อยีสต์ที่มีปริมาณเซลล์ยีสต์ $2x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร (Cabrera *et.al.,* 1988) (ภาคผนวก ค) ปริมาตร 10% ของน้ำสับปะรดที่ใช้หมัก ปล่อยไว้ที่อุณหภูมิห้อง ($30\pm2^{\circ}$ซ) เป็นเวลา 18 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างครั้งละ 10 มิลลิลิตรที่ 0, 2, 4 , 6, 8, 10, 14 และ 18 วัน นำไปวิเคราะห์ pH ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร กรดทั้งหมด น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซ์ แอลกอฮอล์ และปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (ภาคผนวก ข) เมื่อหมักไวน์ครบ 9 และ18 วันถ่ายไวน์ใส่ในขวดใหม่ เก็บบ่มที่ 4°ซ เป็นเวลา 9 เดือน

3.4. การทดสอบชิม

หลังจากเก็บบ่มไวน์ที่ 4 $^{\circ}$ซ เป็นเวลา 3 เดือน เนื่องจากตัวอย่างทดสอบชิมไวน์เป็นงานทดลองที่มีขีดจัดของขนาดบลอคต่ำมาก ในการตรวจสอบคุณภาพกลิ่นรสของบริโภคโดยการใช้ผู้ชิม พบว่าผู้ชิมจะสามารถแยกความแตกต่างได้ดี หากใช้ตัวอย่างในการทดสอบชิมไม่เกิดครั้งละ 6 หน่วย ดังนั้นการทดสอบชิมไวน์ในครั้งนี้ทำโดยใช้ผู้ทดสอบชิมคือ นักศึกษาปริญญาโทคณะอุตสาหกรรมเกษตรที่ได้รับการฝึกฝน ใช้แบบทดสอบชิมทำการประเมินผลทางประสาทสัมผัสจึงวางแผนการทดสอบแบบสุ่มในบล็อคไม่สมบูรณ์สมดุลย์ (balanced incomplete block design, BIB) (สุรพล อุปดิสสกุล, 2537; Soufleros *et al*., 2001) เนื่องจากตัวอย่างในครั้งนี้มีจำนวน 14 ตัวอย่าง จึงใช้แบบทดสอบ BIB ประเภทที่ 4 ที่ใช้คนทดสอบชิม 16 คน (จำนวนสิ่งทดลอง (t) = 16, จำนวนสิ่งทดลองต่อบลอค (k) = 6, จำนวนซ้ำ (r) = 6, จำนวนบลอค (b) = 16, จำนวนครั้งที่

สิ่งทดลองแต่ละคู่ปรากฏร่วมกันในบลอค (λ) = 2) การกำหนดหมายเลขในตัวอย่างที่ให้กรรมการทดสอบใช้ตัวเลข 3 ตำแหน่งจาก chart of random number (Marcus,1974) และให้คะแนนแบบ 20 คะแนนเต็มของ Davis score card, University of Califonia., Davis, USA (ประดิษฐ์ ครุวัณณา, 2523 ; Brown and Ough, 1981) (ภาคผนวก ข) โดยทดสอบชิมความใส สี กลิ่นผลไม้ กลิ่นน้ำส้มสายชู ความเปรี้ยว ความหวาน ตัวตน รสชาติ ความขม และคุณภาพโดยทั่วไป โดยรวม ข้อมูลที่ได้นำมาวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างชุดการทดลองโดยใช้วิธี DMRT (Duncan's Multiple Range Test) เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ที่ได้รับการยอมรับทางการทดสอบชิมสูงสุดไปศึกษาต่อไป

4. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงระหว่างการเก็บบ่มไวน์ที่หมักจากเชื้อยีสต์ 14 สายพันธุ์

บ่มไวน์ที่หมักจากยีสต์ 14 สายพันธุ์จากการทดลองที่ 3 ที่อุณหภูมิห้อง 4°ซ เป็นเวลา 9 เดือน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ทำการเก็บตัวอย่างครั้งละ 10 มิลลิลิตรที่เวลา 15 วัน, 1, 2, 3, 6 และ 9 เดือน นำไปวิเคราะห์ pH ค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร กรดทั้งหมด น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซ์ แอลกอฮอล์ และปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (ภาคผนวก ก) เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในระหว่างการบ่มไวน์

5. ศึกษาผลของพันธุ์สับปะรด ระดับการเจือจาง และสายพันธุ์ยีสต์ที่เหมาะสมในการหมักไวน์สับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียและภูเก็ต

5.1. การเตรียมน้ำสับปะรดที่ใช้หมักไวน์

เลือกสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียและภูเก็ตที่มีขนาดและสีของเปลือกใกล้เคียงกัน นำมาล้างให้สะอาด ปอกเปลือกและแกนกลางออกและแยกส่วนที่เน่าเสียออก หั่นตามขวาง นำมาคั้นน้ำและกรองด้วยผ้าขาวบาง แล้วนำไปเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ระดับ 1:1, 1:2 และ 1:3 ของน้ำสับปะรดที่คั้นได้ต่อน้ำกลั่น ปรับน้ำสับปะรดให้มี pH เป็น 4 และมีความหวานเป็น 24°Brix บรรจุลงในขวดแก้วขนาด 1 ลิตร ปริมาตร 900 มิลลิลิตร แล้วฆ่าเชื้อที่ปนเปื้อนโดยใช้สารละลายโปแตสเซี่ยมเมตาไบซัลไฟต์ในปริมาณ 200 ส่วนในล้านส่วน ปิดจุกด้วยสำลีสะอาด ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง

5.2. การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์

ใช้กล้าเชื้อยีสต์ที่เหมาะสมจากการทดลองข้อที่ 3 มา 4 สายพันธุ์และเตรียมกล้าเชื้อยีสต์ตามข้อ 3.2

5.3. การหมักไวน์

หมักน้ำสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียและภูเก็ตโดยใส่กล้าเชื้อยีสต์ 4 สายพันธุ์ โดยใช้กล้าเชื้อ

ยีสต์ที่มีปริมาณเซลล์ยีสต์ $2x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10% ของน้ำสับปะรดที่ใช้หมัก บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±2°ซ) เป็นเวลา 18 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างครั้งละ 10 มิลลิลิตรที่เวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10, 14 และ 18 วัน นำไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญดังการทดลองที่ 3 และเมื่อหมักไวน์ครบ 9 และ 18 วัน ถ่ายไวน์ใส่ในขวดใหม่ เก็บบ่มเป็นเวลา 3 เดือน จึงนำไปประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสโดยการทดสอบชิม เนื่องจากตัวอย่างในครั้งนี้มีจำนวน 24 ตัวอย่าง จึงใช้แบบทดสอบ BIB แบบแลททิซแบบสมดุลย์ ที่ใช้คนทดสอบชิม 30 คน (t = 25, k = 5, r= 6, b = 30, λ = 1) เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์สับปะรดและระดับการเจือจาง ให้ไวน์มีกลิ่นรสดี โดยได้รับคะแนนการยอมรับสูงสุด

6. ศึกษาผลของการใช้เอนไซม์เพคติเนสในน้ำสับปะรด

6.1. การเตรียมน้ำสับปะรด

ล้างสับปะรดพันธุ์ที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 5 และปอกเปลือกและแกนกลางออก หั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 2.5x2.5x1.25 cm. (Sreenath *et al*.,1994) สุ่มตัวอย่างด้วยวิธีการทำ Quartering (ลักขณา รุจนะไกรกานต์ และ นิธิยา รัตนาปนนท์, 2533) ชั่งให้มีน้ำหนัก 250 กรัม จำนวน 15 ตัวอย่าง แล้วนำมาใส่ในเครื่องปั่นน้ำผลไม้ที่ใช้ความเร็วสูงนาน 5 นาที ($1.5x10^4$ rpm) บดให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน เจือจางด้วยน้ำกลั่น 1 เท่า (250 มิลลิลิตร) หลังจากนั้นนำไปวัด pH

6.2. การเติมเอนไซม์

ใส่เอนไซม์เพคติเนสความเข้มข้น 0, 0.0125, 0.025, 0.0375 และ 0.05%น้ำหนักต่อปริมาตรน้ำสับปะรด (w/v) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±2°ซ) เป็นเวลา 30 นาที (Sreenath *et al*., 1992) หยุดปฏิกิริยาโดยแช่ในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที (Sreenath *et al*., 1992) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างไปวิเคราะห์ปริมาตรผลผลิตที่เพิ่มขึ้น (Brown and Ough, 1981; Sreenath *et al*., 1992; Sreenath *et al*.,1994) เปอร์เซนต์การย่อยสลาย (%degradation) (Sreenath *et al*., 1992; Sreenath *et al*.,1994) pH ความขุ่นของผลไม้ที่ 660 นาโนเมตร ปริมาณตะกอน (Sreenath *et al*.,1994) และความหนืดที่ 100 รอบต่อนาที ที่ 35°ซ (Demir *et.al*., 2000, Demir *et al*., 2001; Sreenath *et al*.,1994; Mutlu *et al*., 1999) (ภาคผนวก ก)

7. ศึกษาผลของระดับความเข้มข้นของเอนไซม์เพคติเนสที่เหมาะสมในการหมักไวน์สับปะรด

7.1. การเตรียมน้ำสับปะรดที่ใช้หมักไวน์

เตรียมน้ำสับปะรดตามข้อ 6.1 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วเติมเอนไซม์เพคติเนสความเข้มข้น 0, 0.0125, 0.05 %น้ำหนักต่อปริมาตรน้ำสับปะรด (w/v) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±2°ซ) เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำมาหยุดปฏิกิริยาในน้ำเดือด (97°ซ) เป็นเวลา 5 นาที และชุดควบคุม (control ซึ่งหมักไวน์สับปะรดโดยไม่มีการเติมเอนไซม์เพคติเนสและไม่ผ่านการยับยั้งเอนไซม์ด้วยความร้อน) หลังจากนั้นเจือจางน้ำสับปะรดด้วยระดับที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 5 ปรับสภาวะให้มี pH 4 และมีความหวานเป็น 24°Brix บรรจุลงในขวดแก้วที่ใช้หมักไวน์ขนาด 1 ลิตร แล้วฆ่าเชื้อที่ปนเปื้อนโดยใช้สารละลายโปแตสเซี่ยมเมตาไบซัลไฟต์ในปริมาณ 200 ส่วนในล้านส่วน ปิดจุกด้วยสำลีสะอาด ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง

7.2. การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์

ใช้กล้าเชื้อยีสต์ที่ได้รับคะแนนการทดสอบชิมสูงสุดจากการทดลองข้อที่ 5 1สายพันธุ์และเตรียมกล้าเชื้อยีสต์ตามข้อ 3.2

7.3. การหมักไวน์

หมักน้ำสับปะรดพันธุ์ที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 5 ด้วยกล้าเชื้อยีสต์ 1 สายพันธุ์ โดยใส่กล้าเชื้อยีสต์ที่มีปริมาณเซลล์ยีสต์ $2x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10% ของน้ำสับปะรดที่ใช้หมัก บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±2°ซ) เป็นเวลา 18 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างครั้งละ 10 มิลลิลิตรที่ 0, 2, 4, 6, 8, 10, 14 และ 18 วัน เพื่อนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีดังการทดลองที่ 3 เมื่อการหมักสิ้นสุดที่ 9 และ 18 วัน ถ่ายไวน์ลงขวดใหม่ที่สะอาดและเก็บบ่มไวน์ที่ 4°ซ เป็นเวลา 1 เดือน หลังจากนั้นนำไปทดสอบชิม เนื่องจากตัวอย่างในครั้งนี้มีจำนวน 4 ตัวอย่าง จึงใช้แบบทดสอบประเภทบลอคสมบูรณ์ RCB ที่ใช้คนทดสอบชิม 20 คน เพื่อคัดเลือกระดับเอนไซม์เพคติเนสที่เหมาะสมในการหมักไวน์ที่มีความสามารถเพิ่มปริมาตรผลผลิตน้ำสับปะรดและสร้างกลิ่นรสดีในไวน์ โดยได้รับคะแนนการยอมรับจากการทดสอบชิมสูงสุด

8. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงระหว่างการเก็บบ่มไวน์สับปะรดที่เติมเอนไซม์เพคติเนสที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

8.1. การวิเคราะห์ผลทางเคมีและการทดสอบชิม

บ่มไวน์สับปะรดจากการทดลองที่ 7 ที่อุณหภูมิห้อง 4°ซ อีกจนครบ 3 เดือน เก็บตัวอย่างครั้งละ 10 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญดังการทดลองที่ 3 และนำไปทดสอบชิมดังข้อ 7.3

8.2. การวิเคราะห์กลิ่นรสของไวน์สับปะรด

นำตัวอย่างไปสกัดสารให้กลิ่นรส และวิเคราะห์กลิ่นรสของไวน์ด้วยเครื่อง Gas Chromatography HP 5890–Mass Selective Detector HP 5972 (GC-MS) (Mateo *et al.,* 1998; Cabaroglu *et al.,* 1997; Gil *et al.,* 1996) และ HP 6850 Gas Chromatography (GC) (ภาคผนวก ก)

8.2.1. การสกัดสารให้กลิ่นรสในไวน์สับปะรด

นำตัวอย่างไวน์จากการทดลองที่ 7 หลังจากเก็บบ่มเป็นเวลา 3 เดือน นำมาสกัดสารให้กลิ่นรสในไวน์สับปะรด โดยวิธี liquid-liquid extraction กับสาร dichloromethane/pentane ความเข้มข้น 40:60 (ปริมาตร/ปริมาตร) ปริมาตร 2 มิลลิลิตรต่อตัวอย่าง 20 มิลลิลิตร สกัดสารในเครื่องเขย่าที่ 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นใส่ 1-butanol เพื่อเป็น internal standard ลงในไวน์ในปริมาณ 1 มิลลิลิตร (1% (ปริมาตร/ปริมาตร) ที่เจือจางด้วยเอทานอล) หลังจากนั้นใส่ Na_2SO_4 ลงไปเพื่อกำจัดน้ำส่วนเกินออก ดูดตัวอย่างสารให้กลิ่นรสในไวน์ที่อยู่ในชั้นของ dichloromethane/pentane ใส่ในหลอกฝาเกลียว และเก็บตัวอย่างที่สกัดได้ที่ -20°ซ เพื่อนำไปฉีดกับเครื่อง GC-MS ต่อไป เตรียมและวิเคราะห์ตัวอย่างอ้างอิงตาม Yang และ Choong (2001).

8.2.2. การวิเคราะห์ด้วย GC-MS

ใช้เครื่อง GC-MS ยี่ห้อ Hewlett Packard 5890 ตรวจวัดสารให้กลิ่นรสดังนี้คือเอทิลอะซิเตท ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ 1-โพรพานอล ไอโซบิวทิวแอลกอฮอล์ และอะซิตอลดีไฮด์ และใช้คอลัมน์ Stabilwax (30 m x 0.25 mm, และมีความหนาของฟิลม์ 0.25 μm) อุณหภูมิที่ใช้ฉีดตัวอย่างและสารที่จะใช้ตรวจจับ (detector) ที่สภาวะ 250°ซ ฉีดตัวอย่างครั้งละ 1.0 μl ด้วยวิธี split mode และตั้งระบบให้วิเคราะห์ตัวอย่างเริ่มต้นที่อุณหภูมิ 35°ซ (5 นาที) เพิ่มอุณหภูมิ 90°ซ ในอัตรา 2.5°ซ ต่อนาที และเพิ่มอุณหภูมิ 220°ซ (5นาที) ในอัตรา 15°ซ ต่อนาที ใช้แก๊สฮีเลียมเป็นตัวพาสารในอัตรา 1 มิลลิลิตรต่อนาที วิเคราะห์ชนิดขององค์ประกอบต่างๆโดยการเปรียบ เทียบเวลากราฟแสดงออกมา และใช้ Mass Selective Detector HP 5972 โดยใช้ Electron Ionization แบบ Scan mode เป็นตัวตรวจจับมวลสารที่อยู่ในช่วง 45-550 amu วัดที่อุณหภูมิ 220 °ซ ที่มีระดับความสามารถในการตรวจวัด (Threshold) ที่ 100 ปริมาณสารองค์ประกอบที่ทำให้เกิดกลิ่นรสที่วัดได้จะขึ้นอยู่กับสารมาตราฐาน (standard) ที่ใช้

8.2.3. การวิเคราะห์ด้วย GC

ใช้เครื่อง GC ยี่ห้อ Hewlett Packard 6850 ที่มี FID (Flame Ionization Detector) เป็น

ตัวตรวจจับสาร วิเคราะห์หาปริมาณ methanol โดยใช้คอลัมน์ Stabilwax (30 m x 0.25 mm และมีความหนาของฟิลม์ 0.25 μm) อุณหภูมิที่ใช้ฉีดตัวอย่างและสารที่จะใช้ตรวจจับ (detector) ที่สภาวะ 240°ซ ฉีดตัวอย่างครั้งละ 1.0 μl และตั้งระบบให้วิเคราะห์ตัวอย่างเริ่มต้นที่อุณหภูมิ 35° ซ (5 นาที) เพิ่มอุณหภูมิ 100°ซ ในอัตรา 4°ซ ต่อนาที และเพิ่มอุณหภูมิ 230°ซ (5นาที) ในอัตรา 15°ซ ต่อนาที ใช้แก๊สฮีเลียมเป็นตัวพาสารในอัตรา 1 มิลลิลิตรต่อนาที วิเคราะห์ชนิดขององค์ประกอบต่างๆโดยการเปรียบเทียบเวลากราฟแสดงออกมา

เพื่อเปรียบเทียบกลิ่นรสของไวน์สับปะรดระหว่างการเติมเอนไซม์และไม่เติมเอนไซม์ เพื่อคัดเลือกระดับความเข้มข้นเอนไซม์เพคติเนสที่เหมาะสมในการหมักไวน์สับปะรด ให้ไวน์มีกลิ่นรสดีโดยได้รับคะแนนการยอมรับสูงสุด