

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การวิจัยในครั้งนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลอง (Experiment Research) โดยได้ดำเนินการวิจัยตามขั้นตอนดังนี้ ขั้นตอนแรก ทำการผลิตไวน์จากเปลือกมังคุด เปลือกแก้วมังกร เปลือกมะม่วง และแกนสับปะรด ขั้นตอนที่ 2 วิเคราะห์ผลการทดลอง เพื่อหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ ค่า pH ปริมาณของแข็งทั้งหมด ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ระหว่างการหมัก เปอร์เซ็นต์กรด ปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ และการยอมรับทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ไวน์ดังกล่าว โดยวิธีการดำเนินวิจัย ผู้วิจัยได้เสนอตามลำดับดังนี้

1. แผนการวิจัย
2. เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย
3. สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย
4. วิธีการทดลอง
5. การวิเคราะห์ข้อมูล

แผนการวิจัย

การวิจัยเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในไวน์จากเปลือกและแกนผลไม้ ใช้แผนการทดลองแบบ CRD (Completely Random Design) ในอิทธิพลแบบกำหนด (Fixed Effect Model) มี 1 ปัจจัย ดังนี้

เปลือกและแกนผลไม้มี 4 ชนิด

- 1.1 เปลือกมังคุด
- 1.2 เปลือกแก้วมังกร
- 1.3 เปลือกมะม่วง
- 1.4 แกนสับปะรด

การวิจัยเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในไวน์จากเปลือกและแกนผลไม้ ในระยะเวลาต่างกัน ใช้แผนการทดลองแบบ CRD (Completely Random Design) ในอิทธิพลแบบกำหนด (Fixed Effect Model) มี 1 ปัจจัย ดังนี้

ระยะเวลามี 3 ช่วง

- 1.1 น้ำเปลือกและแกนผลไม้ที่สกัดด้วยน้ำก่อนทำการหมัก
- 1.2 หมักวันที่ 15
- 1.3 หลังบ่ม 1 เดือน

การวิจัยเพื่อวิเคราะห์ผลการยอมรับ ใช้แผนการทดลองแบบ CRD (Completely Random Design) ในอิทธิพลแบบกำหนด (Fixed Effect Model) มี 1 ปัจจัย ดังนี้

1. ไวน์จากเปลือกมังคุด
2. ไวน์จากเปลือกแก้วมังกร
3. ไวน์จากเปลือกมะม่วง
4. ไวน์จากแกนสับปะรด

เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่อง UV-visible spectrophotometer
2. เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH meter)
3. เครื่องวัดแอลกอฮอล์ (ebullimeter)
4. เครื่องวัดความเข้มข้นของน้ำตาล (hand refractometer)
5. เครื่องชั่งแบบละเอียด
6. หม้อนึ่งความดันไอ
7. ขวดวัดปริมาตร (Volumetric flask)
8. คิวเวท (Cuvette)
9. หลอดทดลอง
10. บีกเกอร์ (Beaker)
11. เครื่องปั่นผสม

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. กรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid)
2. เมทานอล (methanol)
3. สารมาตรฐาน 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) เกรด Analytical
4. 3-5-dinitrosalicylic acid (DNS)
5. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide)
6. โพแทสเซียมโซเดียมทาร์เตรต (Potassium sodiumtartrate)

7. โพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟด์ (Potassium metabisulfide หรือ KMS)
8. กรดซิตริก (Citric acid)
9. ไดแอมโมเนียมฟอสเฟต (Diammonium phosphate หรือ DAP)
10. ฟีนอล์ฟธาเลิน อินดิเคเตอร์(Phenopthalene)

วิธีการทดลอง

1. การผลิตไวน์จากเปลือกและแกนผลไม้ มีขั้นตอนการผลิตดังต่อไปนี้ จาก สภาพ อัจฉริยศรีพงษ์ศรี และไพพรรณ บุตทะ (ม.ป.ป. : 7-9) ดังนี้

1.1 การเตรียมตัวอย่าง

1.1.1 เปลือกมังคุด นำเปลือกมังคุดที่ไม่มียางสีเหลือง และเป็นเปลือกมังคุด แก่จัดสีม่วง นำมาตัดขั้วออก ชูดเอาเปลือกด้านในและหันเป็นชิ้นเล็กๆ

1.1.2 เปลือกแก้วมังกร นำเปลือกแก้วมังกรมาตัดสันเหลี่ยมทู่ๆ ที่เรียงรายอยู่ทั่วไปบนผิวเปลือกออก เอาเฉพาะส่วนที่นุ่มๆ และอาจจะชูดเอาเนื้อที่อาจจะติดกับเปลือกออก ล้างทำความสะอาด และตัดเป็นชิ้นขนาด 1 ตารางเซนติเมตร

1.1.3 เปลือกมะม่วง นำมะม่วงแก้วสุกล้างให้สะอาดปอกเปลือก และหันเป็นชิ้นเล็กๆ

1.1.4 แกนสับปะรด นำแกนสับปะรดพันธุ์น้ำผึ้งมาหันเป็นชิ้นเล็กๆ

1.2 การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น เตรียม 5-10 เปอร์เซ็นต์ (เตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น หรือ starter ก่อนเตรียมน้ำผลไม้ 1 วัน) เตรียมดังนี้

1.2.1 ปลอกเปลือกสับปะรด ล้างน้ำนำมาหันเป็นชิ้นเล็กๆ และคั้นเอาแต่น้ำ กรองเอาเนื้อออก

1.2.2 ปรับปริมาณของแข็งที่ละลายทั้งหมด (Total soluble solid) ให้ได้ 20 องศาบริกซ์ ด้วยน้ำตาลทรายขาว

1.2.3 ปรับ pH ให้อยู่ระหว่าง 4.5 ด้วยกรดซิตริก

1.2.4 เติมสารอาหารโดยเติมไดแอมโมเนียมฟอสเฟต (DAP) ในอัตราส่วน 1 กรัมต่อลิตร

1.2.5 นำมาต้มเดือดนาน 10 นาที เพื่อฆ่าเชื้อ

1.2.6 ตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงหรือประมาณ 35-37 องศาเซลเซียส แล้วบรรจุลงในพลาสติกที่ปลอดเชื้อขนาด 1 ลิตร พลาสติกละ 300-500 มิลลิลิตร และปิดด้วยสำลีที่ฆ่าเชื้อแล้ว

1.2.7 จากนั้นทำการเจียเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* 5013 ที่ได้ทำการต่อเชื้อ (sub culture) ลงในอาหาร YM และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใส่ลงในพลาสติกและเขย่าให้เข้ากัน

1.2.8 หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้ 1-2 วัน เพื่อให้เชื้อเจริญ โดยจะเกิดฟองของก๊าซและขุ่นขึ้นเพราะเชื้อยีสต์

1.3 การเตรียมน้ำผลไม้

1.3.1 น้ำเปลือกมังคุด

1.3.1.1 นำตัวอย่างเปลือกมังคุดที่เตรียมได้ มาปั่นผสมกับน้ำในความเข้มข้นร้อยละ 15 และกรองเอากากออกด้วยผ้าขาวบาง

1.3.1.2 ปรับปริมาณของแข็งที่ละลายทั้งหมด (Total soluble solid) ให้ได้ 20 องศาบริกซ์ ด้วยน้ำตาลทรายขาว

1.3.1.3 ปรับ pH ให้อยู่ระหว่าง 4.5 ด้วยกรดซิตริก

1.3.1.4 เติมสารอาหารโดยเติมไดแอม โมเนียมฟอสเฟต (DAP) ในอัตราส่วน 1 กรัมต่อลิตร

1.3.1.5 เติมโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ (KMS) เพื่อมาเชื้อจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้น 0.2 กรัมต่อลิตร ทิ้งไว้ 1 คืน

1.3.1.6 เก็บในถังหมักปลอดเชื้อพลาสติกขนาด 6 ลิตร หุ้มด้วยพลาสติกสีดำเพื่อใช้ในการหมักไวน์ต่อไป

1.3.2 น้ำเปลือกแก้วมังกร

นำตัวอย่างเปลือกแก้วมังกรที่เตรียมไว้มาปั่นกับน้ำ ในความเข้มข้นร้อยละ 15 กรองเอากากออกด้วยผ้าขาวบาง และดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 1.3.1.2 ถึง 1.3.1.6 ของน้ำเปลือกมังคุด

1.3.3 น้ำเปลือกมะม่วง

นำตัวอย่างเปลือกมะม่วงที่เตรียมไว้มาปั่นผสมกับน้ำ ในความเข้มข้นร้อยละ 15 กรองเอากากออกด้วยผ้าขาวบางและดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 1.3.1.2 ถึง 1.3.1.6 ของน้ำเปลือกมังคุด

1.3.4 น้ำแกนสับปะรด

นำตัวอย่างแกนสับปะรดที่เตรียมได้มาปั่นผสมกับน้ำ ในความเข้มข้นร้อยละ 15 กรองเอากากออกด้วยผ้าขาวบางและดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 1.3.1.2 ถึง 1.3.1.6 ของน้ำเปลือกมังคุด

1.4 การหมัก

1.4.1 การถ่ายเชื้อ

นำหัวเชื้อ (starter) ที่เตรียมไว้ เติมลงในถังหมักที่ได้เตรียมน้ำเปลือกมังคุด น้ำเปลือกแก้วมังกร น้ำเปลือกมะม่วง และน้ำแกนสับปะรดไว้ ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ ในปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหมัก และเขย่าให้เข้ากัน

1.4.2 การหมัก

หมักไว้ที่อุณหภูมิ 10-18 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-15 วัน

1.4.3 การตรวจวัด

วัดปริมาณน้ำตาลที่เหลือด้วย Hand refractometer เมื่อน้ำตาลลดลงเหลือ 11-12 องศาบริกซ์ เติมโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์เพื่อฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้น 0.2 กรัมต่อลิตร ทิ้งไว้ 1 คืน และนำมากรองด้วยผ้าขาวบางและโยไส้ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ ใส่ในถังหมักพลาสติกใหม่ที่สะอาดและแห้ง

1.4.4 การบ่ม

นำไวน์ที่ได้บ่มไว้ในตู้แช่อุณหภูมิประมาณ 8-10 องศาเซลเซียส นาน 1 เดือน ดูดส่วนใสด้านบนเพื่อนำไปบรรจุขวดแล้วเก็บไว้ในตู้เย็น

2. การวิเคราะห์ผลการทดลอง

2.1 การทดสอบเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำเปลือกมังคุด น้ำเปลือกแก้วมังกร น้ำเปลือกมะม่วง และน้ำแกนสับปะรด ที่ได้จากการกรองเอากากออก และจากการหมักวันที่ 3, 6, 9, 12, 15 และหลังบ่ม 1 เดือน ได้ด้วยสาร 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) (Erasto and others. 2004 : 875-880) เปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน ascorbic acid โดยเตรียมสารต้านอนุมูลอิสระเสถียร DPPH ให้มีความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ก) โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย นำมาผสมกับสารตัวอย่างในปริมาณที่เท่ากัน ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปเก็บไว้ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร (Naik and others. 2003 : 97-104) ซึ่งมีหลักการทดสอบคือ สาร DPPH เป็นสารที่มีสีม่วง-เขียว สามารถดูดกลืนแสงได้เมื่อทำปฏิกิริยากับสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สารตัวอย่างจะมีสีเขียวจางลงและจะมีค่าในการดูดกลืนแสงลดลง นำค่าที่ได้มาคำนวณประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ (scavenging (%)) (Zhishen and others. 1997 : 555-559)

$$\text{Scavenging (\%)} = ((A-A_1)/A) \times 100$$

เมื่อกำหนดให้ A คือค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH

A_1 คือค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างหลังทำปฏิกิริยากับ DPPH

ค่า scavenging (%) ที่ได้นำมาใช้ในการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระที่พบในน้ำเปลือกและแกนผลไม้ ไวน์ขณะหมัก และหลังบ่ม

เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์

2.2 ตรวจวัดปริมาณแอลกอฮอล์จากการหมักวันที่ 3, 6, 9, 12, 15 โดยใช้เครื่องมือ Ebulliometer รายละเอียด จากภาคผนวก ก และ ข

2.3 วัด pH

วัดค่า pH จากการหมักวันที่ 0, 3, 6, 9, 12, 15 โดยใช้ pH meter

2.4 การทดสอบหาปริมาณน้ำตาล (ปริมาณของแข็งทั้งหมด : Total soluble solid)

ตรวจหาปริมาณน้ำตาลจากการหมักวันที่ 0, 3, 6, 9, 12, 15 โดยใช้ Hand refractometer

2.5 หาความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหลือ (ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ระหว่างการหมัก) ตรวจหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ระหว่างการหมักวันที่ 0, 3, 6, 9, 12, 15 โดยใช้วิธี dinitrosalicylic method (DNS method) รายละเอียด จากภาคผนวก ก

2.6 เปอร์เซ็นต์กรด

ตรวจหาเปอร์เซ็นต์กรด ในรูปกรดทาทาริก จากไวน์ที่บ่มนาน 1 เดือน ในรูปกรดทาทาริก รายละเอียด จากภาคผนวก ก

2.7 หาปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์

ตรวจหาปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์อิสระ จากไวน์ที่บ่มนาน 1 เดือน รายละเอียด จากภาคผนวก ก

2.8 ศึกษาการยอมรับ (Sensory Test) ผลึกภัณฑ์ไวน์จากเปลือกและแกนผลไม้ โดยวิธีการทดสอบทางด้านประสาทสัมผัส มีรายละเอียดการดำเนินการวิจัยดังต่อไปนี้

นำตัวอย่างไวน์จากเปลือกและแกนผลไม้ทั้ง 4 ชนิด ที่บ่มนาน 1 เดือน ใส่ในแก้วไวน์ปริมาณ ¼ แก้ว พร้อมให้รหัสเป็นตัวเลข 3 หลัก โดยใช้ตามตัวเลขในตารางสุ่ม (ปรมาณี่อ่านเรื่อง. 2547 : 70-71) อธิบายวิธีการและขั้นตอนการประเมินคุณภาพไวน์แก่ผู้ทดสอบก่อนทำการประเมิน เสิร์ฟน้ำดื่มที่ใช้ปั่นปาระหว่างชิมตัวอย่างผลิตภัณฑ์ไวน์ พร้อมทั้งใบลงคะแนนขนาดกระดาษ A4 ที่แสดงเรื่องให้ทดสอบในด้านความใส สี กลิ่น รสชาติ การยอมรับรวม โดยให้ลงคะแนนระดับความพอใจจากไม่ชอบมากถึงชอบมาก 7 คะแนน (Hedonic 7 Scales-Test) (แสดงในภาคผนวก ค) ให้แก่ผู้ทดสอบที่มีประสบการณ์บริโภคไวน์ ไม่จำกัดเพศจำนวน 20 คน อยู่นอกในอำเภอเมือง จังหวัดมหาสารคาม

การวิเคราะห์ข้อมูล

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลมีดังนี้

1. สถิติพื้นฐานได้แก่
 - 1.1 ค่าเฉลี่ย (\bar{X})
 - 1.2 ร้อยละ (%)
 - 1.3 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)

2. สถิติที่ใช้ในการทดสอบเปรียบเทียบปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในไวน์จากเปลือกและแกนผลไม้แตกต่างกัน ใช้ F-test สำหรับวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way Analysis of Variance) ในการวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Random Design) เปรียบเทียบความแตกต่างเป็นรายคู่โดย Duncan's Multiple Range Test ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

3. สถิติที่ใช้ในการทดสอบเปรียบเทียบการยอมรับไวน์จากเปลือกและแกนผลไม้แตกต่างกัน ใช้ F-test สำหรับวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way Analysis of Variance) ในการวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Random Design) เปรียบเทียบความแตกต่างเป็นรายคู่โดย Duncan's Multiple Range Test ทำการทดลอง 2 ซ้ำ