

ภาคผนวก

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร

ภาคผนวก ก

ผลการวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีและทางจุลินทรีย์

ตารางผนวกที่ 1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด ($^{\circ}$ Brix) ในระหว่างการหมัก

No.	Treatment	Fermentation time (d)					
		0 day	3 days	6 days	9 days	12 days	15 days
1	M2xS1	20.0±0.00	14.0±0.00	10.00±0.00	7.2±0.00	7.2±0.00	7.0±0.00
2	M2xS2	20.0±0.00	15.0±1.41	9.50±0.71	7.1±0.14	7.1±0.14	7.0±0.00
3	M2xT	20.0±0.00	15.0±0.00	10.00±0.00	6.9±0.14	6.9±0.14	6.7±0.14
4	M2xK	20.0±0.00	14.0±0.00	10.75±0.35	7.3±0.14	7.3±0.14	7.0±0.00
5	M3xS1	20.0±0.00	10.0±0.00	7.00±0.00	6.8±0.00	6.8±0.00	6.9±0.14
6	M3xS2	20.0±0.00	10.0±0.71	7.00±0.00	6.6±0.56	6.6±0.56	6.9±0.14
7	M3xT	20.0±0.00	10.0±0.71	8.00±1.41	6.7±0.42	6.7±0.42	6.9±0.14
8	M3xK	20.0±0.00	15.0±0.00	8.50±0.71	6.7±0.42	6.7±0.42	6.9±0.14
9	M4xS1	20.0±0.00	5.0±0.00	7.00±0.00	6.7±0.42	6.7±0.42	6.9±0.14
10	M4xS2	20.0±0.00	8.0±0.00	7.00±0.00	6.3±0.14	6.3±0.14	6.9±0.14
11	M4xT	20.0±0.00	8.0±0.00	7.00±0.00	6.3±0.14	6.3±0.14	6.3±0.14
12	M4xK	20.0±0.00	8.0±0.00	7.00±0.00	6.5±0.14	6.5±0.14	6.6±0.28

ตารางผนวกที่ 2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดทั้งหมด (ร้อยละ) ในระหว่างการหมักไวน์สับปะรด

No.	Treatment	Fermentation time (d)					
		0 day	3 days	6 days	9 days	12 days	15 days
1	M2xS1	0.89±0.00	0.96±0.02	0.91±0.10	0.91±0.05	0.87±0.05	0.89±0.02
2	M2xS2	0.89±0.00	0.93±0.03	0.86±0.02	0.80±0.05	0.80±0.05	0.84±0.00
3	M2xT	0.89±0.00	0.98±0.00	0.86±0.10	0.86±0.03	0.87±0.05	0.93±0.03
4	M2xK	0.89±0.00	0.98±0.05	1.00±0.02	0.89±0.02	0.94±0.05	0.89±0.02
5	M3xS1	0.77±0.00	0.91±0.05	0.79±0.02	0.77±0.00	0.82±0.08	0.81±0.00
6	M3xS2	0.77±0.00	0.77±0.05	0.82±0.02	0.75±0.08	0.75±0.08	0.68±0.02
7	M3xT	0.77±0.00	0.81±0.10	0.96±0.17	0.79±0.03	0.82±0.02	0.75±0.08
8	M3xK	0.40±0.00	0.84±0.05	0.80±0.05	0.75±0.08	0.75±0.03	0.74±0.00
9	M4xS1	0.40±0.00	0.58±0.07	0.68±0.07	0.65±0.03	0.65±0.03	0.60±0.00
10	M4xS2	0.40±0.00	0.58±0.03	0.61±0.12	0.59±0.05	0.66±0.15	0.56±0.00
11	M4xT	0.40±0.00	0.63±0.10	0.42±0.15	0.44±0.13	0.35±0.10	0.35±0.05
12	M4xK	0.40±0.00	0.63±0.05	0.59±0.05	0.54±0.02	0.56±0.00	0.56±0.05

ตารางผนวกที่ 3 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในระหว่างการหมัก

No.	Treatment	Fermentation time (d)					
		0 day	3 days	6 days	9 days	12 days	15 days
1	M2xS1	3.77±0.00	3.65±0.02	3.66±0.02	3.77±0.14	3.78±0.07	3.76±0.02
2	M2xS2	3.77±0.00	3.77±0.01	3.77±0.01	3.87±0.00	3.83±0.02	3.86±00.00
3	M2xT	3.77±0.00	3.76±0.02	3.76±0.02	3.82±0.02	3.77±0.00	3.84±0.03
4	M2xK	3.77±0.00	3.69±0.01	3.69±0.01	3.80±0.01	3.73±0.01	3.77±0.01
5	M3xS1	3.80±0.00	3.81±0.01	3.81±0.01	3.90±0.01	3.87±0.01	3.87±0.02
6	M3xS2	3.80±0.00	3.95±0.07	3.95±0.07	4.01±0.01	3.96±0.05	3.94±0.02
7	M3xT	3.80±0.00	3.79±0.01	3.79±0.01	3.94±0.01	3.86±0.01	3.91±0.01
8	M3xK	3.80±0.00	3.83±0.01	3.83±0.01	4.08±0.25	3.92±0.08	3.91±0.01
9	M4xS1	3.88±0.00	4.04±0.17	4.04±0.17	4.16±0.01	4.09±0.03	4.14±0.01
10	M4xS2	3.88±0.00	4.55±0.37	4.55±0.37	4.20±0.00	4.17±0.01	4.22±0.00
11	M4xT	3.88±0.00	4.34±0.05	4.34±0.05	4.38±0.25	4.65±0.40	4.82±0.20
12	M4xK	3.88±0.00	4.17±0.08	4.17±0.08	4.18±0.03	4.15±0.02	4.20±0.01

ตารางผนวกที่ 4 การเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีน (mg/ml) ในระหว่างการหมักไวน์สับปะรด

No.	Treatment	Fermentation time (d)					
		0 day	3 days	6 days	9 days	12 days	15 days
1	M2xS1	700.00±0.00	269.52± 6.06	346.07± 0.84	154.88±19.70	110.47±7.74	110.06± 0.59
2	M2xS2	700.00±0.00	311.55±43.94	337.62±12.46	172.08±59.69	149.58±33.59	124.10± 7.83
3	M2xT	700.00±0.00	284.28±25.59	360.24±17.561	179.10± 4.12	112.68± 6.48	116.60±13.38
4	M2xK	700.00±0.00	298.09± 1.69	422.62±10.78	208.75±25.84	113.03±10.36	147.26±66.83
5	M3xS1	542.86±0.00	287.14±11.45	310.11±14.98	83.21± 8.42	67.44±18.44	105.00± 9.26
6	M3xS2	542.86±0.00	213.70±14.29	282.73± 5.89	123.45± 3.87	90.18± 9.18	123.51±24.66
7	M3xT	542.86±0.00	236.07±28.79	306.19±51.18	132.08±15.58	86.67± 8.92	159.64±13.47
8	M3xK	542.86±0.00	287.62±18.85	341.90±33.37	109.76±10.44	113.33±28.28	152.67±13.21
9	M4xS1	514.26±0.00	119.76±88.56	224.76± 8.41	123.81± 6.39	78.09± 0.16	105.42±12.54
10	M4xS2	514.29±0.00	148.69± 9.93	217.50±10.95	107.26± 9.42	115.06±41.66	104.58±14.90
11	M4xT	514.29±0.00	188.57±54.88	231.19± 2.69	111.13±13.55	111.13±10.35	105.53± 0.76
12	M4xK	514.29±0.00	164.16± 8.25	235.48±24.92	101.60±37.62	81.90± 2.35	89.58±19.61

ตารางผนวกที่ 5 การเปลี่ยนแปลงฟรีอัลฟาอะมิโนไนโตรเจนอิสระ (mg/l) ในระหว่างการหมักไวน์สับปะรด

No.	Treatment	Fermentation time (d)					
		0 day	3 days	6 days	9 days	12 days	15 days
1	M2xS1	84.72±0.00	9.32± 0.16	11.57±0.88	25.29±0.15	32.19±0.77	31.25± 1.82
2	M2xS2	84.72±0.00	5.04± 0.88	9.85±2.90	23.27±1.36	34.92±1.54	30.65± 3.51
3	M2xT	84.72±0.00	6.78± 0.36	7.86±1.51	18.77±0.53	24.40±1.41	17.44± 5.78
4	M2xK	84.72±0.00	6.64± 0.18	11.61±1.94	23.47±0.29	25.35±1.75	13.55± 0.90
5	M3xS1	122.82±0.00	10.19± 0.76	21.43±1.96	28.08±2.18	64.53±0.77	53.97± 0.14
6	M3xS2	122.82±0.00	8.51± 1.04	18.43±4.93	31.98±3.15	62.30±0.14	56.84± 0.27
7	M3xT	122.82±0.00	10.02± 2.11	11.63±1.22	30.03±3.54	44.74±0.55	135.37±35.71
8	M3xK	122.82±0.00	11.79± 0.15	12.70±1.13	40.23±16.40	40.72±0.20	60.81± 0.14
9	M4xS1	236.11±0.00	27.09±14.24	72.86±5.96	85.92±1.29	139.98±3.79	136.60±13.47
10	M4xS2	236.11±0.00	34.00±10.82	65.38±3.36	99.88±3.88	128.37±3.36	137.35±34.17
11	M4xT	236.11±0.00	34.57± 8.43	45.24±3.08	73.97±18.04	120.93±4.06	147.61±20.20
12	M4xK	236.11±0.00	24.28± 0.95	36.65±2.88	83.18±4.52	97.17±7.78	87.00±37.74

ตารางผนวกที่ 6 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (mg/l) ในระหว่างการหมักไวน์สับปะรด

No.	Treatment	Fermentation time (d)					
		0 day	3 days	6 days	9 days	12 days	15 days
1	M2xS1	17.88±0.00	12.43±4.74	4.24±0.60	2.35±3.07	1.14±0.06	0.51±0.12
2	M2xS2	17.88±0.00	14.78±0.20	2.90±0.04	1.57±0.22	0.66±0.01	0.46±0.01
3	M2xT	17.88±0.00	20.96±1.46	3.34±0.01	1.45±0.59	0.68±0.27	0.40±0.06
4	M2xK	17.88±0.00	18.12±0.02	5.20±0.48	2.88±0.81	0.95±0.31	0.35±0.04
5	M3xS1	16.88±0.00	8.01±0.92	0.82±0.03	0.39±0.01	0.25±0.02	0.37±0.02
6	M3xS2	16.88±0.00	8.37±0.02	1.05±0.14	0.52±0.15	0.33±0.01	0.44±0.01
7	M3xT	16.88±0.00	14.60±1.33	1.08±0.16	0.46±0.06	0.21±0.01	0.36±0.01
8	M3xK	16.88±0.00	3.85±0.69	2.44±0.21	0.83±0.11	0.27±0.01	0.24±0.02
9	M4xS1	14.98±0.00	0.69±0.02	0.28±0.01	0.36±0.03	0.29±0.56	0.33±0.07
10	M4xS2	14.98±0.00	2.24±0.13	0.26±0.03	0.41±0.03	0.35±0.01	0.34±0.02
11	M4xT	14.98±0.00	3.52±0.55	0.23±0.02	0.37±0.01	0.27±0.07	0.29±0.04
12	M4xK	14.98±0.00	4.43±0.92	0.27±0.21	0.32±0.04	0.25±0.03	0.32±0.01

ตารางผนวกที่ 7 การเปลี่ยนแปลงของ Relative activity (ร้อยละ) ในระหว่างการหมักไวน์สับปะรด

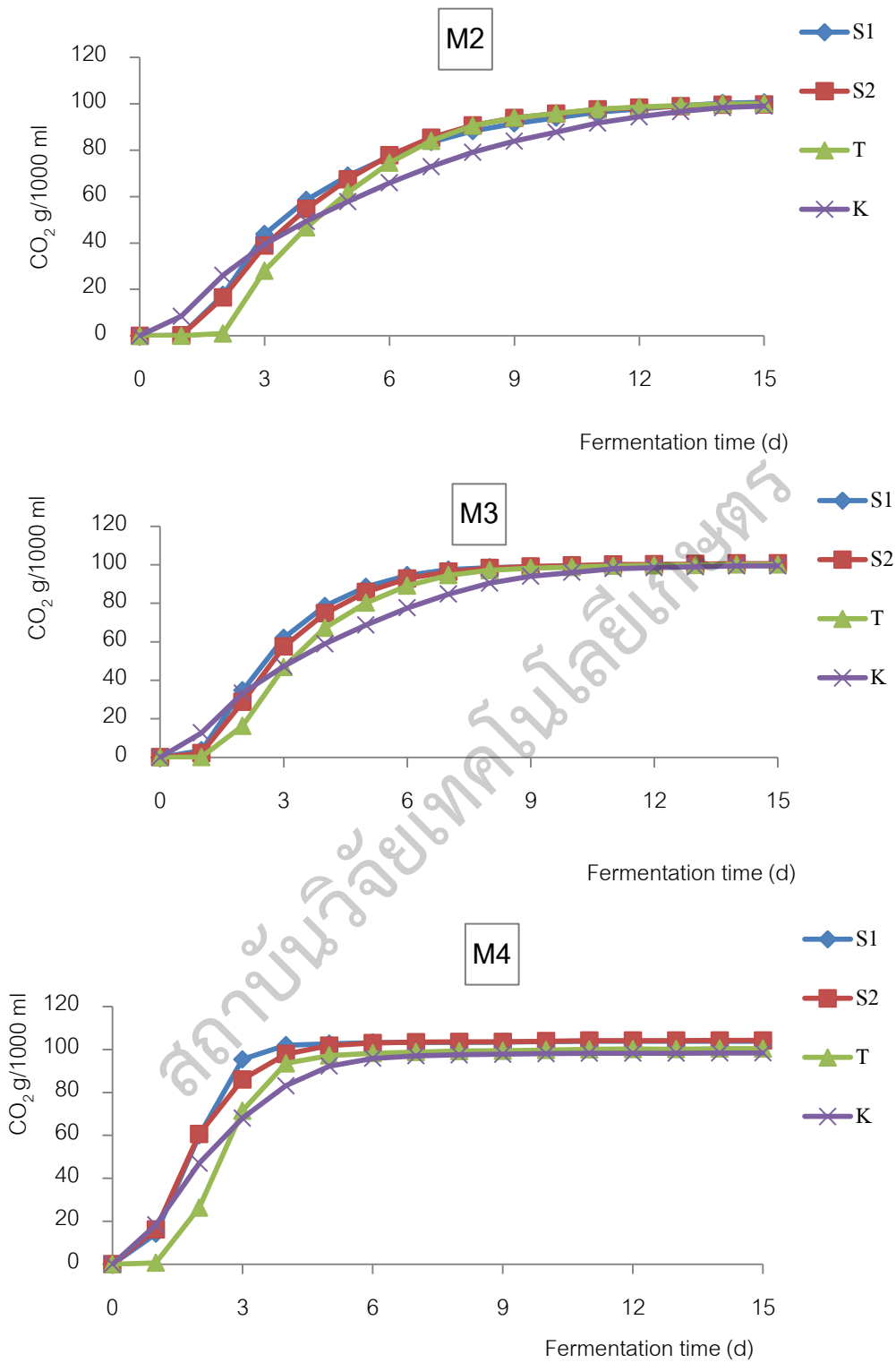
No.	Treatment	Fermentation time					
		0 day	3 days	6 days	9 days	12 days	15 days
1	M2xS1	100.00±0.00	41.77± 3.44	49.40± 8.30	57.56± 6.41	48.62±10.17	38.08± 4.42
2	M2xS2	100.00±0.00	52.78±14.87	49.18±14.06	54.62±13.20	45.05± 0.61	38.16± 3.69
3	M2xT	100.00±0.00	52.17±14.95	55.54± 7.24	61.07±20.54	47.29± 8.64	43.13± 6.45
4	M2xK	100.00±0.00	48.05±13.17	53.69± 9.86	64.96±14.27	48.79±11.96	44.43± 7.57
5	M3xS1	100.00±0.00	52.63± 3.23	54.01±18.13	61.56±13.37	49.13± 6.92	34.67± 1.82
6	M3xS2	100.00±0.00	57.07± 0.07	42.77± 5.90	52.12±11.63	35.80± 1.72	29.82± 6.46
7	M3xT	100.00±0.00	61.45± 1.30	53.11± 0.81	61.78± 4.68	31.06± 2.71	35.81± 4.24
8	M3xK	100.00±0.00	67.97± 3.36	47.39± 5.17	67.19± 3.97	44.75± 0.97	40.02± 2.20
9	M4xS1	100.00±0.00	27.44± 3.94	27.67±20.06	17.44±10.85	2.76± 3.94	0.00± 0.00
10	M4xS2	100.00±0.00	15.35± 0.00	5.35± 1.64	13.95± 0.00	4.42± 6.25	7.44±10.52
11	M4xT	100.00±0.00	20.93± 2.63	13.02± 3.29	23.49±18.09	7.67± 0.98	0.00± 0.00
12	M4xK	100.00±0.00	35.81± 7.23	12.79± 7.57	26.51±10.52	6.51± 9.20	2.79± 1.97

ตารางผนวกที่ 8 ผลการนับจำนวนยีสต์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ YEPD (cfu/ml) ในระหว่างการหมัก
ไวน์สับปะรด

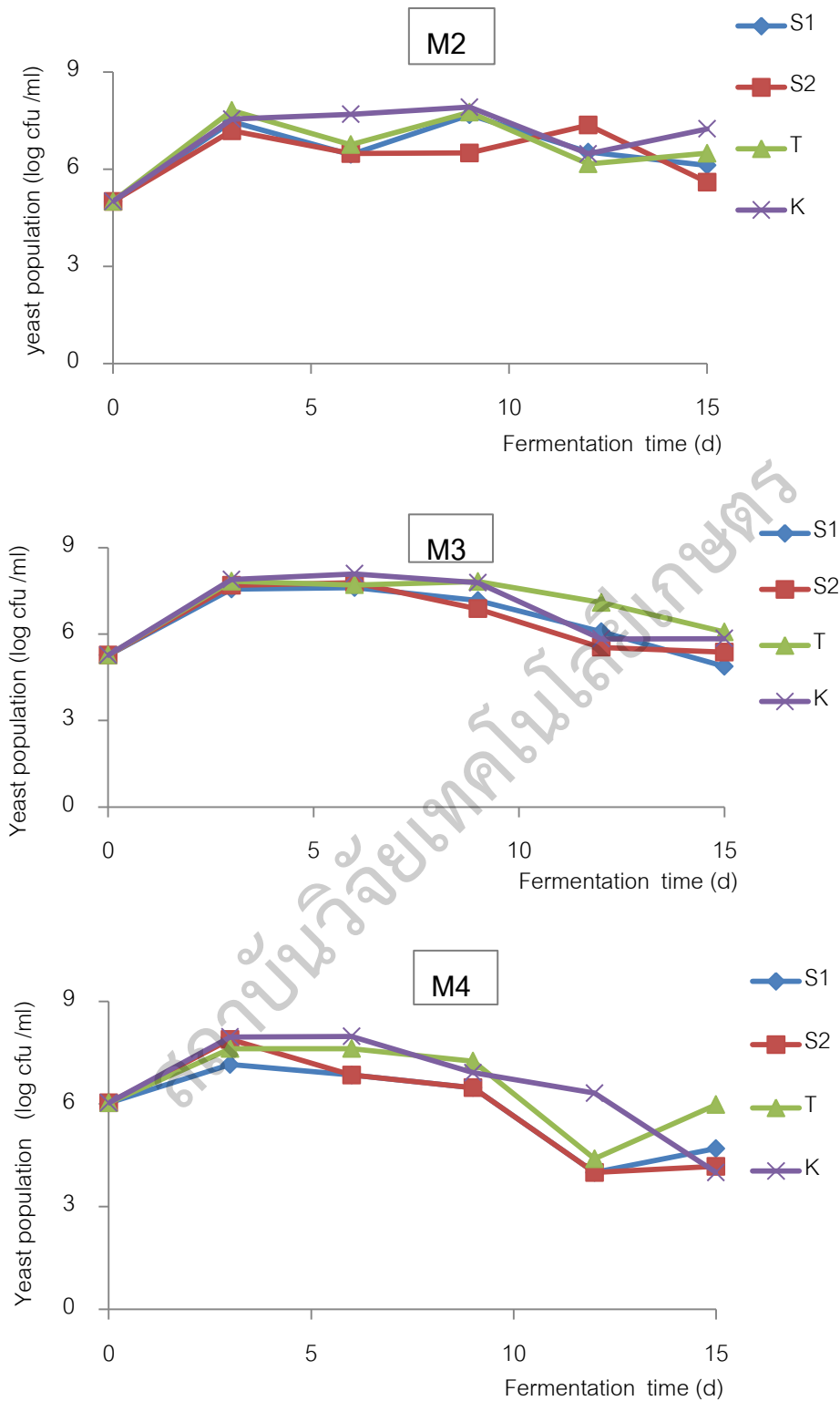
No.	Treatment	Fermentation time (d)					
		0 day	3 days	6 days	9 days	12 days	15 days
1	M2xS1	1.02×10^5	2.96×10^7	2.84×10^6	4.76×10^7	3.39×10^6	1.32×10^6
2	M2xS2	1.02×10^5	1.54×10^7	3.06×10^6	3.20×10^6	2.32×10^7	4.00×10^5
3	M2xT	1.02×10^5	6.50×10^7	5.77×10^6	5.37×10^7	1.46×10^6	3.13×10^6
4	M2xK	1.02×10^5	3.52×10^7	4.97×10^7	8.27×10^7	3.00×10^6	1.76×10^7
5	M3xS1	1.84×10^5	3.63×10^7	4.08×10^7	1.46×10^7	1.21×10^6	7.50×10^4
6	M3xS2	1.84×10^5	4.95×10^7	6.15×10^7	7.50×10^6	3.45×10^5	2.35×10^5
7	M3xT	1.84×10^5	6.80×10^7	5.07×10^7	6.70×10^7	1.25×10^7	1.18×10^6
8	M3xK	1.84×10^5	7.85×10^7	1.24×10^8	6.10×10^7	6.80×10^5	6.95×10^5
9	M4xS1	1.08×10^6	1.42×10^7	7.00×10^6	3.00×10^6	1.00×10^4	5.00×10^4
10	M4xS2	1.08×10^6	7.70×10^7	7.05×10^6	3.00×10^6	1.00×10^4	1.50×10^4
11	M4xT	1.08×10^6	4.13×10^7	4.13×10^7	1.78×10^7	2.50×10^4	9.60×10^5
12	M4xK	1.08×10^6	9.10×10^7	9.45×10^7	8.20×10^6	2.08×10^6	1.00×10^4

ตารางผนวกที่ 9 ผลการนับจำนวนยีสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (cell/ml) ในระหว่างการหมัก
ไวน์สับปะรด

No.	Treatment	Fermentation time (d)					
		0 day	3 days	6 days	9 days	12 days	15 days
1	M2xS1	1.00×10^6	8.00×10^7	7.61×10^6	5.56×10^7	8.89×10^6	2.78×10^6
2	M2xS2	1.00×10^6	4.11×10^7	5.17×10^7	1.39×10^7	5.00×10^6	1.17×10^6
3	M2xT	1.00×10^6	2.72×10^7	7.22×10^6	4.94×10^7	8.33×10^6	3.89×10^6
4	M2xK	1.00×10^6	2.22×10^7	2.72×10^7	6.28×10^7	1.67×10^7	1.77×10^7
5	M3xS1	1.00×10^6	9.28×10^7	2.72×10^7	8.33×10^6	5.56×10^6	1.56×10^6
6	M3xS2	1.00×10^6	4.83×10^7	1.61×10^7	6.67×10^6	4.44×10^6	9.44×10^5
7	M3xT	1.00×10^6	8.33×10^7	3.00×10^7	6.00×10^7	3.61×10^7	4.67×10^6
8	M3xK	1.00×10^6	2.17×10^7	3.33×10^7	7.83×10^7	3.11×10^7	9.33×10^6
9	M4xS1	1.00×10^6	1.19×10^8	3.83×10^7	5.00×10^6	2.78×10^6	9.17×10^6
10	M4xS2	1.00×10^6	1.31×10^8	6.67×10^6	3.89×10^6	2.78×10^6	8.33×10^5
11	M4xT	1.00×10^6	1.17×10^8	8.89×10^6	1.83×10^7	3.89×10^6	1.61×10^6
12	M4xK	1.00×10^6	4.28×10^7	4.11×10^7	4.11×10^7	1.00×10^7	3.89×10^5



ภาพผนวกที่ 1 จลนพลศาสตร์การหมักของไวน์สับปะรดที่ระควมสุกแก่ต่างกัน 3 ระดับ



ภาพผนวกที่ 2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณยีสต์ในระหว่างการหมักไวน์สับปะรดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

YEPD

ภาคผนวก ข
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ YEPD (yeast potato dextrose agar)

yeast extract	10.0	กรัม
peptone	20.0	กรัม
dextrose	20.0	กรัม
agar	15.0	กรัม
distilled water	1,000.0	มิลลิลิตร

วิธีการ

ซึ่งส่วนผสมทั้งหมด ผสมให้เข้ากันแล้วปรับพีเอชให้ได้ 6.5 ± 0.2 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121.1 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร

ภาคผนวก ค
การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี

การวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมด

1. วัสดุอุปกรณ์

- (1) Burette
- (2) Erlenmeyer flask
- (3) Pipette
- (4) Beaker

2. สารเคมี

(1) 0.1 N sodium hydroxide (ซึ่ง sodium hydroxide 4 กรัม จากนั้นละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร)

(2) 1% phenolphthalein indicator (ซึ่ง phenolphthalein 1 กรัม ละลายใน 95 % แอลกอฮอล์ จากนั้นปรับให้ได้ 100 มิลลิลิตรด้วย 95 % แอลกอฮอล์)

3. วิธีการวิเคราะห์ตัวอย่าง

(1) นำตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร เติมน้ำ 20 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

(2) หยด phenolphthalein indicator 2-3 หยด

(3) นำตัวอย่างที่เจือจางและหยด phenolphthalein indicator จากข้อ (2) ไปไตเตรทสารละลายมาตรฐาน sodium hydroxide จนจุดยุติในขวดรูปชมพู่เปลี่ยนจากสีแดงกลายเป็นสีชมพูอ่อน) ทำการทดลอง 3 ครั้ง

สำหรับการคำนวณหาปริมาณกรดทั้งหมด (w/w หรือ w/v) เทียบเป็น

กรดซिटริก 1 ml ของ 0.1 N NaOH ทำปฏิกิริยาสมมูลพอดีกับกรดซिटริก 0.007 กรัม

การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีแบรดฟอร์ด (Bollag *et al.*, 1996)

1. สารเคมี

(1) สารละลายโปรตีนมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA)

ซึ่ง BSA 0.0500 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 25 มิลลิลิตร (solution A) ปิเปตสารละลาย BSA (solution A) 1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร (solution B)

(2) Bradford stock solution ประกอบด้วย

1) เอทานอลร้อยละ 95 (Merck, Darmstadt, Germany) 100 มิลลิลิตร

2) กรดฟอสฟอริกร้อยละ 86 (J.T.Baker, USA) 200 มิลลิลิตร

3) coomassie brilliant blue G 250 (Fluka, UK) 350 มิลลิลิตร

จากนั้นทำการซึ่ง coomassie brilliant blue G 250 350 มิลลิกรัม ละลายในกรดฟอสฟอริก เติมน้ำกลั่น เก็บในขวดสีชา อุณหภูมิ (27± 3 องศาเซลเซียส) เก็บที่อุณหภูมิห้อง

(3) Bradford working buffer (BWB)

1) เอทานอลร้อยละ 95 (Merck, Darmstadt, Germany) 15 มิลลิลิตร

2) กรดฟอสฟอริกร้อยละ 86 (J.T.Baker, USA) 30 มิลลิลิตร

3) Bradford stock solution 30 มิลลิลิตร

4) น้ำกลั่น (distilled water) 425 มิลลิลิตร

ผสมส่วนผสมให้เข้ากันกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 (wintech, Japan) แล้วเก็บในขวดสีชาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2. การทำกราฟมาตรฐาน

การทำกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลาย BSA

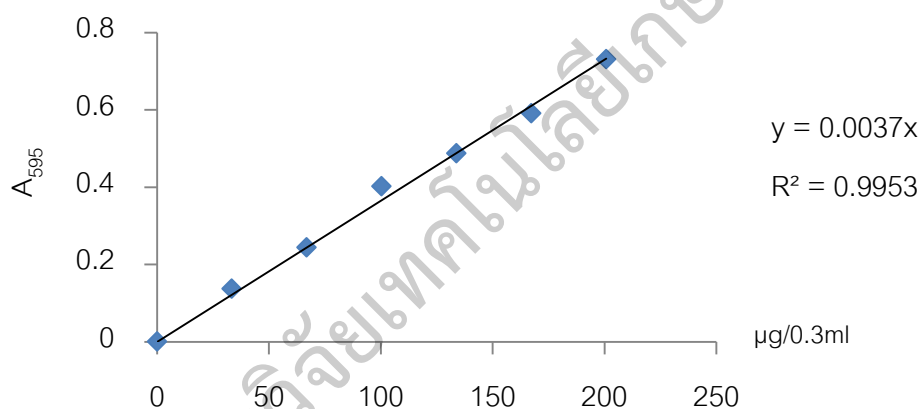
(1) ดูดสารละลาย BSA (solution B) ใส่ในหลอดทดลอง 0, 0.05, 0.10, 0.15, 0.2, 0.25 และ 0.3 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ครบ 0.3 มิลลิลิตร (ตารางผนวกที่ 10)

(2) เติมน้ำกลั่น BWB 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

(3) วัด absorbance ที่ 595 นาโนเมตร (A_{595}) แล้วนำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร กับความเข้มข้นของ BSA

ตารางผนวกที่ 10 ค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ของ BSA

solution	tube number						
	1	2	3	4	5	6	7
BSA (ml)	0.00	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30
H ₂ O (ml)	0.30	0.25	0.20	0.15	0.10	0.05	0.00
BWB (ml)	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
BSA(μ g/0.3 ml)	0.00	33.47	66.93	100.40	133.87	167.33	200.80
A ₅₉₅	0.00	0.137	0.244	0.402	0.487	0.591	0.731



ภาพผนวกที่ 3 กราฟมาตรฐาน BSA สำหรับการวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธีเบรดฟอร์ด

3. วิธีการวิเคราะห์ตัวอย่าง

- (1) ดูดตัวอย่างมา 0.3 ml
- (2) เติมสารละลาย BWB 3 ml เขย่า
- (3) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร (A₅₉₅) แล้วนำค่าที่ได้ไป

คำนวณหาปริมาณโปรตีน

การวัดปริมาณ Total sugar ด้วย Phenol – sulphuric method

1. สารเคมี

- (1) สารละลายฟีนอล 5 % (W/V) (Merck, Darmstadt, Germany)
- (2) กรดกำมะถันเข้มข้น (Merck, Darmstadt, Germany)

2. วิธีการวิเคราะห์

- (1) เตรียมตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณน้ำตาล 1 มิลลิตร ลงในหลอดแก้ว อาจทำได้ครั้งละหลายตัวอย่าง ขณะเดียวกันก็ทำ blank ด้วยการใช้น้ำ 1 มิลลิตร
- (2) เติมสารละลายฟีนอล 1 มิลลิตร ลงในตัวอย่าง ในข้อที่ 1 ผสมให้เข้ากัน
- (3) เติมกรดกำมะถันเข้มข้น 5 มิลลิตร ลงในสารผสมในข้อที่ 2 ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วเขย่าแรงๆ ผสมให้เข้ากัน
- (4) ตั้งทิ้งต่อไปอีก 20 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

การตรวจสอบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีน (proteolytic activity) ตามวิธีดัดแปลงจาก Chomsri (2001) และ Khan *et al.* (2003)

1. สารเคมี

- (1) trichloroacetic acid (TCA) (Merck, Darmstadt, Germany)
เตรียมโดยชั่ง TCA 5 กรัม ผสมกับน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิตร
- (2) เคซีน (casein; fluka)
เตรียมโดยชั่งเคซีน 1 กรัม ละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7 ปริมาตร 100 มิลลิตร

2. วิธีการวิเคราะห์

- (1) ดูดสารละลาย casein ความเข้มข้นร้อยละ 1 จำนวน 2 มิลลิตร ใส่ในหลอดทดลอง แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที
- (2) เติมเอนไซม์ 0.5 มิลลิตร ในหลอดทดลองที่มีสารละลาย casein ร้อยละ 1 ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วบ่มเพื่อให้เอนไซม์ทำปฏิกิริยากับสับสเตรทที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที
- (3) หยุดปฏิกิริยาเอนไซม์โดยเติม TCA ร้อยละ 5 จำนวน 4 มิลลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 (whatman)
- (4) นำส่วนใสมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร แล้วนำไปคำนวณหาค่ากิจกรรมของโปรตีเอส

(5) ทำ blank test ตามวิธีข้อ 1-4 แต่เติมสารละลาย TCA ร้อยละ 5 ก่อนเติมเอนไซม์

3. การคำนวณหาค่ากิจกรรมโปรตีนเอส

$$\text{ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (enzyme activity)} = \frac{A \times B \times C}{V \times T}$$

โดยที่

A คือ ความเข้มข้นของไทโรซีนที่ได้จากการคำนวณจากกราฟมาตรฐานไทโรซีน (ไม่โครแกรมต่อมิลลิลิตร)

B คือ ปริมาตรของสารละลายในหลอดทดลองที่เอนไซม์ทำปฏิกิริยา (มิลลิลิตร)

C คือ ความเจือจางของตัวอย่าง

V คือ ปริมาตรของเอนไซม์ที่ใช้ในหลอดทดลองที่เอนไซม์ทำปฏิกิริยา (มิลลิลิตร)

T คือ เวลาที่เอนไซม์ทำปฏิกิริยากับสับสเตรท (นาที)

4. การเตรียมกราฟมาตรฐานไทโรซีน

(1) สารเคมี

1) ไทโรซีน (tyrosine) (Merck, Darmstadt, Germany)

2) Hydrochloric acid 1 M (HCl 1 M.) (Merck, Darmstadt, Germany)

3) Sodium hydroxide 0.5 M (NaOH 0.5 M ; Merck, Darmstadt, Germany)

เตรียมโดยชั่งไทโรซีน 0.0300 กรัม จากนั้นเติมสารละลาย HCl 1 M จำนวน 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร (solution A) ปิเปตสารละลายไทโรซีน (solution A) 2 มิลลิลิตร เติม NaOH 0.5 M จำนวน 1 มิลลิลิตร (solution B)

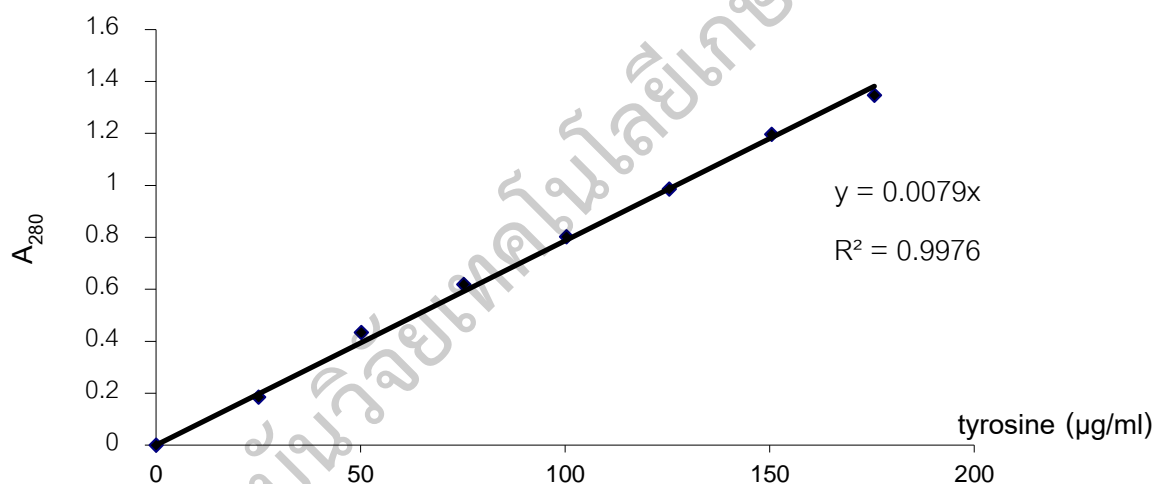
5. วิธีการทำกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลายไทโรซีน

(1) ดูดสารละลาย ไทโรซีน (solution B) ใส่ในหลอดทดลอง 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 และ 4 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 4 มิลลิลิตร

(2) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร (A_{280}) แล้วนำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐานระหว่าง A_{280} กับความเข้มข้นของสารละลายไทโรซีน

ตารางผนวกที่ 11 ค่าการดูดกลืนแสง (A_{280}) ของไทโรซีน

solution	tube number								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
tyrosine (ml)	0.00	0.50	1.00	1.50	2.00	2.50	3.00	3.50	4.00
H ₂ O (ml)	4.00	3.50	3.00	2.50	2.00	1.50	1.00	0.50	0.00
tyrosine(μ g/ml)	0	25.08	50.16	75.25	100.33	125.41	150.50	175.58	200.67
A_{280}	0	0.185	0.433	0.618	0.802	0.985	1.196	1.346	1.794



ภาพผนวกที่ 4 กราฟมาตรฐานไทโรซีนสำหรับการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของโปรตีน

การจำแนกโปรตีน ตามวิธีของ Laemmi (1970)

1. สารเคมี

(1) Acrylamide/Bis : 30%T, 2.67% C

146.0 กรัม Acrylamide

4.0 กรัม N,N'-Methylen-bis Acrylamide

ปรับปริมาตรให้ได้ 500 ml กรอง และเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C ในที่มืด และเก็บได้นานสูงสุด 30 วัน

(2) 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8

54.45 กรัม Tris base

150.00 มิลลิลิตร Distilled water

ปรับให้ได้ pH 8.8 ด้วย HCl แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 300 ml และเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

(3) 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8

6.0 กรัม Tris base

60.0 มิลลิลิตร Distilled water

ปรับให้ได้ pH 8.8 ด้วย HCl แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 ml และเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

(4) 10%(w/v) SDS

10.0 กรัม SDS

60.0 มิลลิลิตร Distilled water

ละลาย SDS 10 g ด้วยน้ำกลั่น 60 ml คนเบาๆ และปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml

หมายเหตุ: ใส่ขวดสีชาเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

(5) 10%(w/v) ammonium persulfate

100.0 มิลลิกรัม ammonium persulfate

1.0 มิลลิลิตร Distilled water

ละลาย ammonium persulfate 100 mg ด้วยน้ำกลั่น 1 ml

หมายเหตุ: เตรียมใหม่ทุกครั้งที่มีการใช้งาน

(6) 0.5% (w/v) bromophenol blue

5.0 กรัม	bromophenol blue
100.0 มิลลิลิตร	Distilled water

(7) Sample Buffer (SDS reducing buffer : 62.5 mM Tris buffer, pH 6.8, 20% glycerol, 2% SDS, 5% β -mercaptoethanol)

3.55 มิลลิลิตร	Distilled water
1.25 มิลลิลิตร	0.5 M Tris-HCl, pH 6.8
2.00 มิลลิลิตร	10% SDS
2.50 มิลลิลิตร	Glycerol
0.20 มิลลิลิตร	0.5%(w/v)bromophenol blue (ในน้ำ)

ก่อนนำมาใช้งานให้นำส่วนผสมดังกล่าวมา 950 ul จากนั้นเติม β -mercaptoethanol 50 ul ทำการเจือจางตัวอย่างด้วย sample buffer อัตราส่วน 1:4 และให้ความร้อน 95 °C เป็นเวลา 5 นาที

(8) 5x Electrode (Running) buffer (1x = 25 mM tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS ,pH 8.3)

45.0 กรัม	Tris base
216.0 กรัม	Glycine
15.0 กรัม	SDS

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 3000 ml (ไม่ควรทำการปรับพีเอชด้วยกรดหรือด่าง เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C.) ก่อนใช้ทำการเจือจางโดยใช้ 5x Electrode (Running) buffer 300 ml ปรับด้วยน้ำกลั่น 1,200 ml สำหรับการรันเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 1 ครั้ง

หมายเหตุ: ถ้ามีตะกอนเกิดขึ้นควรจะอุ่นที่อุณหภูมิ 37 °C ก่อนนำมาใช้งาน

(9) การเตรียมสีย้อม

1.0 กรัม	Coomassie brilliant blue R
400.0 มิลลิลิตร	Methanol
100.0 มิลลิลิตร	Glacial Acetic acid

ผสมให้เข้ากัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

(10) การล้างสีย้อม

400 ml	Methanol
100 ml	Glacial Acetic acid
800 ml	Distilled water

ตารางผนวกที่ 12 การเตรียมเจล SDS-PAGE

	Separating Gel 12% (0.375 M Tris, pH 8.8)	Stacking Gel 4.0% (0.125 M Tris, pH 6.8)
Acrylamide/Bis : 30%T, 2.67% C (ml)	4.00	1.30
Distilled water (ml)	3.35	6.10
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8 (ml)	2.50	-
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8 (ml)	-	2.50
10%(w/v) SDS (ml)	0.10	0.10
10%(w/v) ammonium persulfate (μ l)	100.00	50.00
TEMED (μ l)	10.00	10.00
Total monomer (ml)	10.00	10.00

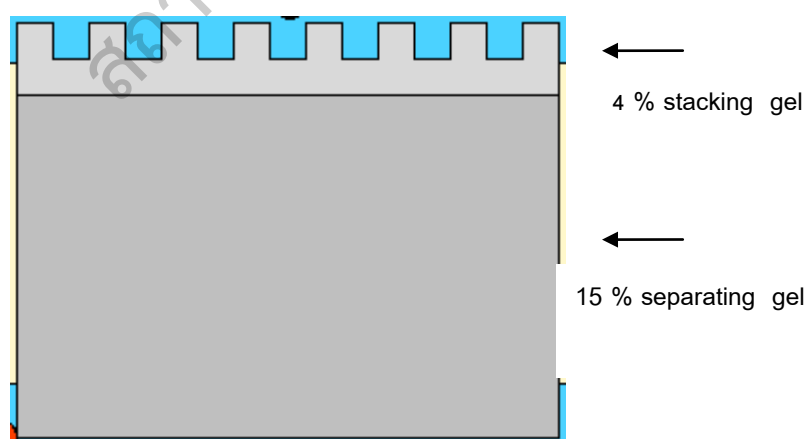
ตารางที่ 13 องค์ประกอบของโปรตีนมาตรฐาน (low molecular weight ของ GE Healthcare)

ชนิดโปรตีน	ขนาดโมเลกุล (kDa)
phosphorylase b	97.0
albumin	66.0
ovalbumin	45.0
carbonic anhydrase	30.0
Trypsine inhibitor	20.10
α -lactalbumin	14.40

2. วิธีการเตรียมเจล

(1) 12 % separating gel ทำโดยปเปตสาร acrylamide/Bis 4.00 มิลลิลิตร น้ำกลั่น 3.35 มิลลิลิตร 1.5 M Tris-HCl pH 8.8 2.50 มิลลิลิตร และ 10 % SDS 0.10 มิลลิลิตร นำไปใส่อากาศ 20 นาที จากนั้นเติม 10% ammonium persulfate 50 ไมโครลิตร และ TEMED 5 ไมโครลิตร

(2) 4 % Stacking Gel ทำโดยปเปตสาร acrylamide/Bis 1.30 มิลลิลิตร น้ำกลั่น 6.10 มิลลิลิตร 0.5 M Tris-HCl pH 6.8 2.50 มิลลิลิตร และ 10 % SDS 0.10 มิลลิลิตร นำไปใส่อากาศ 20 นาที จากนั้นเติม 10% ammonium persulfate 50 ไมโครลิตร และ TEMED 5 ไมโครลิตร



ภาพผนวกที่ 5 ลักษณะแผ่นเจล SDS

การวิเคราะห์ free alpha amino nitrogen (FAN)

1. สารเคมี

(1) สารละลาย S1

1) di-sodium hydrogenphosphate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; Fisher Chemicals, Fisher Scientific, Loughborough Leies, UK) 100 กรัม

2) potassium di-hydrogen phophate (KH_2PO_4) (Riedel-de Haen, Germany) 60 กรัม

3) ninhydrin (Fluka, Czech Rep) 5 กรัม

4) fructose 3 กรัม

เตรียมโดยซึ่งส่วนผสมทั้งหมด ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร เก็บในขวดสีชา เก็บได้นาน 1 สัปดาห์

(2) สารละลาย S2

เตรียมโดยซึ่ง potassium iodate (KIO_3) 2 กรัม ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 600 มิลลิลิตร และเอทานอลปริสุทธิ 400 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

(3) สารละลายไกลซีนมาตรฐาน เตรียมโดย ซึ่งไกลซีน 107.2 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร แล้วทำการเจือจาง 1:100 ก่อนนำไปใช้ในการวิเคราะห์

2. วิธีการวิเคราะห์

ตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ควรมีปริมาณ free α -amino nitrogen ประมาณ 1-3 กรัม/ลิตร ตัวอย่างเช่น น้ำองุ่นทำการเจือจาง 1:100 ไวน์ทำการเจือจาง 1:50 น้ำสับปะรดทำการเจือจาง 1:100 ไวน์สับปะรดทำการเจือจาง 1:50-1:100 เป็นต้น ซึ่งการวิเคราะห์นี้มีวิธีการดังนี้

(1) คุดสารละลายตัวอย่าง 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง

(2) เติมสารละลาย S1 จำนวน 1 มิลลิลิตร ปิดฝา นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 16 นาที

(3) ทำให้เย็นโดยนำไปแช่น้ำให้เย็น (ประมาณ 20 นาที)

(4) เติมสารละลาย S2 จำนวน 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

(5) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร

(6) ทำ blank test โดยใช้ น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง แล้วทำตามข้อ (2)-(5)

(7) วิเคราะห์ปริมาณ free α -amino nitrogen ในสารละลายไกลซีนมาตรฐาน โดยใช้สารละลายไกลซีนมาตรฐาน (3) ในข้อ 1. จำนวน 2 มิลลิลิตร แทนตัวอย่างแล้วทำตามข้อ (2)-(5)

3. การคำนวณ

$$\text{FAN (mg/l)} = \frac{\text{A 570 ของตัวอย่าง} \times 2 \times \text{การเจือจาง}}{\text{A 570 ของสารละลายไกลซีนมาตรฐาน}}$$

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร

ภาคผนวก ง
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ตารางผนวกที่ 14 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด
ในน้ำส้มปะรดที่ระดับความสุกแก่ 3 ระดับ

Source of variation	Degree of freedom	Sum of square	Mean square	F value	Prob.
Maturity level	2	8.233	4.111	437.383*	0.000
Error	3	0.028	0.009		
Total	5	8.251			

หมายเหตุ: C.V. = 0.69%

* หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางผนวกที่ 15 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณกรดทั้งหมดในน้ำส้มปะรด
ที่ระดับความสุกแก่ 3 ระดับ

Source of variation	Degree of freedom	Sum of square	Mean square	F value	Prob.
Maturity level	2	0.265	0.133	58.036*	0.004
Error	3	0.007	0.002		
Total	5	0.272			

หมายเหตุ: C.V. = 6.50%

* หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางผนวกที่ 16 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของค่าพีเอชในน้ำสับปะรดที่ระดับ
ความสุกแก่ 3 ระดับ

Source of variation	Degree of freedom	Sum of square	Mean square	F value	Prob.
Maturity level	2	0.060	0.030	6.339 ^{ns}	0.084
Error	3	0.014	0.005		
Total	5	0.075			

หมายเหตุ: C.V. = 1.88%

ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางผนวกที่ 17 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณ FAN ในน้ำสับปะรด
ที่ระดับความสุกแก่ 3 ระดับ

Source of variation	Degree of freedom	Sum of square	Mean square	F value	Prob.
Maturity level	2	24927.628	12463.814	150.820*	0.001
Error	3	247.920	82.640		
Total	5	25175.549			

หมายเหตุ: C.V. = 6.14%

* หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางผนวกที่ 18 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณโปรตีนในน้ำสับปะรดที่ระดับความสุกแก่ 3 ระดับ

Source of variation	Degree of freedom	Sum of square	Mean square	F value	Prob.
Maturity level	2	0.003	0.002	7.465 ^{ns}	0.068
Error	3	0.001	0.000		
Total	5	0.004			

หมายเหตุ: C.V. = 0.00%

ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางผนวกที่ 19 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในน้ำสับปะรดที่ระดับความสุกแก่ 3 ระดับ

Source of variation	Degree of freedom	Sum of square	Mean square	F value	Prob.
Maturity level	2	8.712	4.356	1.249 ^{ns}	0.403
error	3	10.461	3.487		
total	5	19.173			

หมายเหตุ: C.V. = 11.26%

ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางผนวกที่ 20 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของค่าความสว่าง (L) ในไวน์สับปะรด

Source of variation	Degree of freedom	Sum of square	Mean square	F value	Prob.
Maturity level	2	77.031	38.515	5.3327*	0.022
Yeast stain	3	8.379	2.793	0.386 ^{ns}	0.765
Maturity x yeast	6	136.888	22.815	3.155*	0.043
error	12	86.770	7.231		
total	23	309.068			

หมายเหตุ: C.V. = 3.82%

* หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางผนวกที่ 21 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของค่าความเป็นสีแดง (a) ในไวน์สับปะรด

Source of variation	Degree of freedom	Sum of square	Mean square	F value	Prob.
Maturity level	2	1.670	0.835	9.790*	0.003
Yeast stain	3	0.560	0.187	2.187 ^{ns}	0.142
Maturity x Yeast	6	3.321	0.554	6.491*	0.003
error	12	1.023	0.085		
total	23	6.574			

หมายเหตุ: C.V. = 51.90%

* หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางผนวกที่ 22 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของค่าความเป็นสีเหลือง (b)
ในไวน์สับปะรด

Source of variation	Degree of freedom	Sum of square	Mean square	F value	Prob.
Maturity level	2	29.375	14.687	9.547*	0.003
Yeast state stain	3	9.567	3.189	2.073 ^{ns}	0.157
Maturity x yeast	6	98.617	16.436	10.684*	0.00
Error	12	18.461	1.538		
Total	23	156.020			

หมายเหตุ: C.V. = 5.67%

* หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 23 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของความขุ่นในไวน์สับปะรด

Source of variation	Degree of freedom	Sum of square	Mean square	F value	Prob.
Maturity level	2	409.890	204.945	3.509 ^{ns}	0.063
Yeast state stain	3	77.130	25.710	0.440 ^{ns}	0.728
Maturity x yeast	6	2801.490	466.915	7.995*	0.001
error	12	700.790	58.399		
total	23	3989.300			

หมายเหตุ: C.V. = 8.32%

* หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางผนวกที่ 24 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด
ในไวน์สับปะรด

Source of variation	Degree of freedom	Sum of square	Mean square	F value	Prob.
Maturity level	2	1.418	0.709	2.946 ^{ns}	0.091
Yeast state stain	3	1.334	0.445	1.848 ^{ns}	0.192
Maturity x yeast	6	2.641	0.440	1.830 ^{ns}	0.176
error	12	2.887	0.241		
total	23	8.280			

หมายเหตุ: C.V. = 7.32%

ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางผนวกที่ 25 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณกรดทั้งหมดในไวน์สับปะรด

Source of variation	Degree of freedom	Sum of square	Mean square	F value	Prob.
Maturity level	2	0.557	0.279	255.221*	0.000
Yeast state stain	3	0.028	0.009	8.677*	0.002
Maturity x yeast	6	0.070	0.012	10.723*	0.000
error	12	0.013	0.001		
total	23	0.669			

หมายเหตุ: C.V. = 4.40%

* หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางผนวกที่ 26 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของค่าพีเอชในไวน์สับปะรด

Source of variation	Degree of freedom	Sum of square	Mean square	F value	Prob.
Maturity level	2	1.299	0.649	161.339*	0.00
Yeast state stain	3	0.253	0.084	20.948*	0.00
Maturity x yeast	6	0.371	0.062	15.372*	0.00
error	12	0.048	0.004		
total	23	1.971			

หมายเหตุ: C.V. = 1.57%

* หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางผนวกที่ 27 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณแอลกอฮอล์ในไวน์สับปะรด

Source of variation	Degree of freedom	Sum of square	Mean square	F value	Prob.
Maturity level	2	1.268	0.634	2.312 ^{ns}	0.142
Yeast state stain	3	12.02	0.401	1.461 ^{ns}	0.274
Maturity x yeast	6	3.206	0.534	1.949 ^{ns}	0.153
error	12	3.290	0.274		
total	23	8.965			

หมายเหตุ: C.V. = 4.50%

ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางผนวกที่ 28 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของ FAN ในไวน์สับปะรด

Source of variation	Degree of freedom	Sum of square	Mean square	F value	Prob.
Maturity level	2	104452.83	52226.417	8.089*	0.006
Yeast state stain	3	11342.241	3780.747	0.586 ^{ns}	0.636
Maturity x yeast	6	39865.515	6644.253	1.029 ^{ns}	0.453
error	121	77479.791	6456.649		
total	23	233140.381			

หมายเหตุ: C.V. = 85.48%

* หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางผนวกที่ 29 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณโปรตีนในไวน์สับปะรด

Source of variation	Degree of freedom	Sum of square	Mean square	F value	Prob.
Maturity level	2	112189.846	56094.923	4.428*	0.036
Yeast state stain	3	46071.725	15357.242	1.212 ^{ns}	0.347
Maturity x yeast	6	90199.006	15033.168	1.187 ^{ns}	0.376
error	121	152020.736	12668.395		
total	23	400481.312			

หมายเหตุ: C.V. = 19.37%

* หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ผนวก 30 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณน้ำตาลทั้งหมดใน
ไวน์สับปะรด

Source of variation	Degree of freedom	Sum of square	Mean square	F value	Prob.
Maturity level	2	0.052	0.026	11.055*	0.002
Yeast state stain	3	0.050	0.017	7.094*	0.005
Maturity x yeast	6	0.026	0.004	1.857ns	0.170
error	121	0.028	0.002		
total	23	0.156			

หมายเหตุ: C.V. = 12.09%

* หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางผนวกที่ 31 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของคะแนนด้านลักษณะปรากฏของไวน์
สับปะรด

Source of variation	Degree of freedom	Sum of square	Mean square	F value	Prob.
Panelist	9	41.03	4.56	14.21*	0.00
Maturity level	2	2.75	1.37	4.28*	0.02
Yeast state stain	3	1.36	0.45	1.42 ^{ns}	0.24
Maturity x yeast	6	0.56	0.09	0.29 ^{ns}	0.94
error	99	31.76	0.32		
total	119	77.47			

หมายเหตุ: C.V. = 33.72%

* หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางผนวกที่ 32 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของคะแนนด้านกลิ่นของไวน์สับปะรด

Source of variation	Degree of freedom	Sum of square	Mean square	F value	Prob.
Panelist	9	34.32	3.81	3.92*	0.00
Maturity level	2	9.33	4.66	4.80 ^{ns}	0.10
Yeast state stain	3	2.60	0.87	0.89 ^{ns}	0.48
Maturity x yeast	6	12.76	2.13	2.19 ^{ns}	0.05
error	99	96.21	0.97		
total	119	155.23			

หมายเหตุ: C.V. = 33.74%

* หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางผนวกที่ 33 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของคะแนนด้านรสชาติของไวน์สับปะรด

Source of variation	Degree of freedom	Sum of square	Mean square	F value	Prob.
Panelist	9	56.59	0.79	7.86*	0.00
Maturity level	2	6.58	3.29	4.12*	0.02
Yeast state stain	3	4.43	1.48	1.85 ^{ns}	0.14
Maturity x yeast	6	6.09	1.02	1.27 ^{ns}	0.28
error	99	79.15	6.29		
total	119	152.85			

หมายเหตุ: C.V. = 27.69%

* หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางผนวกที่ 34 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของคะแนนด้านรสชาติตกค้างในปาก
ของไวน์สับปะรด

Source of variation	Degree of freedom	Sum of square	Mean square	F value	Prob.
Panelist	9	30.67	3.41	7.81*	0.000
Maturity level	2	3.13	1.57	3.59*	0.03
Yeast state stain	3	0.38	0.12	0.29 ^{ns}	0.83
Maturity x yeast	6	1.072	0.18	0.41 ^{ns}	0.87
error	99	43.20	0.43		
total	119	78.45			

หมายเหตุ: C.V. = 38.17%

* หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางผนวกที่ 35 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของคะแนนด้านความชอบรวมไวน์
สับปะรด

Source of variation	Degree of freedom	Sum of square	Mean square	F value	Prob.
Panelist	9	6.92	0.77	4.49*	0.00
Maturity level	2	0.66	0.33	1.92 ^{ns}	0.15
Yeast state stain	3	1.53	0.51	2.98*	0.03
Maturity x yeast	6	1.66	0.28	1.61 ^{ns}	0.15
error	99	16.96	0.17		
total	119	27.73			

หมายเหตุ: C.V. = 38.97%

* หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางผนวกที่ 36 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของคะแนนคะแนนรวมของไวน์
สี่ปีระด

Source of variation	Degree of freedom	Sum of square	Mean square	F value	Prob.
Panelist	9	475.48	52.83	9.27*	0.00
Maturity level	2	90.14	45.07	7.91*	0.00
Yeast state stain	3	26.3	8.94	1.57 ^{ns}	0.20
Maturity x yeast	6	62.97	10.49	1.84 ^{ns}	0.10
error	99	563.95	5.69		
total	119	1219.37			

หมายเหตุ: C.V. = 21.77%

* หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ภาคผนวก จ

แบบทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสของไวน์สับปะรด

WINE EVALUATION CHART

Name.....Place.....Date.....'

Order	Wine code	Appearance (3 scores)	Aroma/bouquet (6 scores)	Taste (6 scores)	After taste (3 scores)	Overall (2 Scores)	Total (20 scores)

Comments

.....

.....

.....

หลักเกณฑ์การให้คะแนน

Appearance (ลักษณะสิ่งที่มองเห็นด้วยตาเปล่าหรือมีอะไรอยู่ในไวน์บ้าง)

สีและความใสของไวน์ เป็นสิ่งที่บ่งบอกถึงลักษณะของไวน์ ซึ่งหมายถึง แนวโน้มของคุณภาพ หรือ ข้อบกพร่องของไวน์ ไวน์ผลไม้ที่มีสีเข้ม (ทั้งไวน์แดง และไวน์ขาว) โดยทั่วไปจะแสดงถึงไวน์ที่หนัก (full-bodied) ไวน์ชมพู หรือ Rose' ควรเป็นสีชมพู และบางที่อาจเป็นสีส้มเล็กน้อยในกรณีที่เป็น ไวน์เก่า หรือไวน์ที่ได้รับการบ่มไว้นาน (old wine) ไวน์ผลไม้ทุกชนิดควรรีใส (transparent) ไม่มี ตะกอน หรือสารแขวนลอย ถ้าเป็นไวน์ใหม่ (young wine) จะใสวาว ขณะที่ไวน์เก่า อาจจะมี ความขุ่นเล็กน้อยที่กันขวด ส่วนไวน์ที่เก่ามากๆ จะมีตะกอนเกิดขึ้น การให้คะแนนควรเป็นไปตาม เกณฑ์ดังนี้

3 = excellent มีความใสวาว มีสีตามธรรมชาติของไวน์ผลไม้ และไม่มีสีอื่นปลอมปน

2 = good มีความใสและสีตามธรรมชาติของไวน์

1 = poor มีตะกอนหรือสารแขวนลอย (colloid) มาก มีสีไม่ธรรมชาติของไวน์

0 = objectionable มีลักษณะขุ่น มีสีไม่ดี เช่น สีน้ำตาลแดง

Aroma and bouquet (ความรู้สึกรับได้จากการสูดดม หรือมีกลิ่น อะไรบ้างในไวน์)

ขั้นตอนที่ 2 ของการประเมินคุณภาพไวน์ผลไม้ คือ การสูดดมเพื่อหากลิ่นของผลไม้หรือ bouquet ซึ่งหมายถึง กลิ่นของผลไม้รวมถึงกลิ่นอื่นๆ ที่หอมฉุน หรือซับซ้อน โดยการแกว่งแก้ว ไวน์ เพื่อให้หน้าไวน์กระจายบนผิวแก้วด้านใน ซึ่งทำให้กลิ่นของเอสเทอร์ (ester) ระเหยออกมา โดยการแกว่งหลายๆ ครั้ง ไวน์บางชนิดอาจมีกลิ่นของสมุนไพร กลิ่นผลไม้ นั่น ดังนั้นจะต้อง สามารถแยกความแตกต่างได้ และถ้าเป็นไวน์ผลไม้ควรบ่งบอกถึงชนิดของผลไม้ที่ใช้ทำไวน์นั้นๆ ได้ในทุกๆ ชนิดของไวน์จะต้องมีความสมดุลของกลิ่นเหล่านั้น ซึ่งจะทำให้ได้กลิ่นที่หอมฉุนและเป็น ที่พึงพอใจในบางครั้งอาจเรียกว่า nose การให้คะแนน ควรเป็นไปตามเกณฑ์ดังนี้

6 = extraordinary มีลักษณะที่เด่นพิเศษคือ มีความสมดุลของกลิ่นหอมฉุน และสามารถบ่งบอกถึงชนิดของผลไม้ หรือสายพันธุ์ขององุ่นที่ใช้ทำไวน์นั้นๆ ไม่มีกลิ่นอื่นปน

5 = excellent มีความหอมฉุนที่สมดุล

4 = good มีบางกลิ่นที่เด่นชัดออกมา มีความสมดุลเล็กน้อย และไม่มีกลิ่นอื่นปน

3 = fair มีกลิ่นจางๆ หรือกลิ่นกลาง มีความสมดุลเล็กน้อย และไม่มีกลิ่นอื่นปน

2 = poor ไม่สามารถรับกลิ่นได้ หรือไม่สามารถบอกกลิ่นไวน์ได้ หรือมีกลิ่นอื่นปน

1 = unacceptable มีกลิ่นแปลกปลอมที่ชัดเจน ไม่มีความสมดุล

0 = objectionable มีกลิ่นที่รับไม่ได้ และไม่มีกลิ่นอื่นปน

Taste (สิ่งที่ได้รับจากการกลืน หรือไวน์มีรสชาติอย่างไรบ้าง)

ลิ้นของมนุษย์สามารถรับและบอกรสชาติต่างๆ ได้ เช่น ความเป็นกรด ความขม ความฝืด ความหวาน และคุณภาพอื่นๆ ของไวน์ ซึ่งลักษณะต่างๆ เหล่านี้จะสามารถเรียนรู้ได้จากประสบการณ์ ส่วนต่างๆ ในปากจะเชื่อมต่อกับระยะที่เกี่ยวกับการได้กลิ่น ดังนั้น การรับรสชาติของไวน์จะมีความสัมพันธ์กับกลิ่นของไวน์ด้วย ซึ่งจะต้องทำการฝึกฝนเรื่อยๆ โดยการจิบไวน์เล็กน้อย และกลั้วให้ทั่วปาก ดังนั้น ผิวด้านในปากทุกส่วนจะได้สัมผัสกับไวน์ หลังจากนั้นบ้วนทิ้ง และทิ้งให้ปากว่าง หรือเป่าและสูดลมเข้าปากประมาณ 10-15 วินาที จึงสามารถชิมตัวอย่างต่อไป การให้คะแนนควรเป็นไปตามเกณฑ์ ดังนี้

6 = extraordinary มีลักษณะที่เด่นพิเศษของผลไม้ มีความเข้มข้นของรสชาติ มีความสมดุลของความเป็นกรด ความหวาน และความแรงของแอลกอฮอล์

5 = excellent มีความสมดุลของกรด ความหวาน และความแรงของแอลกอฮอล์ และสามารถบอกรสชาติของผลไม้หรือสายพันธุ์องุ่นได้

4 = good มีความสมดุลของรสชาติแต่ไม่บ่งบอกถึงชนิดของไวน์ได้

3 = fair มีรสชาติกลางๆ มีความสมดุลของรสชาติเล็กน้อย

2 = poor ไม่สามารถบอกรสชาติไวน์ผลไม้ได้ และมีรสชาติแปลกปลอมไม่สมดุล

1 = unacceptable มีรสชาติที่รับไม่ได้ ไม่มีความสมดุล

0 = objectionable มีรสชาติที่น่ารังเกียจ ไม่สมดุล

After taste (กลิ่นและรสชาติที่ยังหลงเหลือค้างในปาก)

ทำการจิบไวน์เล็กน้อย กลั้วให้ทั่วปาก และอมไว้ในปาก 2-3 วินาที จึงกลืนลงไป และพิจารณาว่า รสชาติและกลิ่นของไวน์ ยังคงค้างอยู่ในปากนานเท่าไร ไวน์ที่เบา (light body) จะมีกลิ่นและรสชาติค้างอยู่ในปากในระยะสั้น แต่ไวน์ที่หนัก (full body) กลิ่นและรสชาติจะสามารถค้างอยู่ในปากได้นานประมาณ 10-15 วินาที การให้คะแนนควรเป็นไปตามเกณฑ์ดังนี้

3 = excellent มีกลิ่นและรสชาติค้างในปากที่ทำให้เกิดความรู้สึกที่น่าพึงพอใจ และอยู่ได้นานมากกว่า 10 วินาที

2 = good มีกลิ่นและรสชาติค้างในปากที่ทำให้เกิดความรู้สึกที่น่าพึงพอใจ และอยู่ได้นานประมาณ 10 วินาที

1 = poor ไม่มีกลิ่นและรสชาติค้างในปาก

0 = objectionable มีกลิ่นและรสชาติที่ไม่พึงพอใจค้างในปาก

Overall impression (ความพอใจในคุณภาพหรือมูลค่าของไวน์ผลไม้รวม) หมายถึงระดับคุณภาพทั้งหมดของไวน์ผลไม้ เมื่อเปรียบเทียบกับไวน์อื่นๆที่เป็นชนิดเดียวกัน และที่เกี่ยวกับมูลค่าของไวน์

2 = excellent เป็นไวน์พิเศษทั้งคุณภาพ และมูลค่า

1 = good สามารถใช้เป็นตัวแทนของไวน์ชนิดนั้นๆ ได้ และมีคุณภาพที่ยอมรับได้

0 = poor ไม่มีลักษณะของความเป็นไวน์และไม่มีคุณภาพ

การตีความคะแนนที่ได้รับ

18-20 คะแนน = เป็นไวน์ที่ดีเยี่ยมมาก มีลักษณะที่ดีกว่าไวน์ปกติ ไม่มีลักษณะของไวน์ที่ไม่ดีเลย

15-17 คะแนน = เป็นไวน์ที่ดีเยี่ยม ซึ่งอาจจะมีสิ่งที่ไม่ดีเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

12-14 คะแนน = เป็นไวน์ที่ดี อาจมีลักษณะที่ไม่ดีเพียง 1-2 ลักษณะ

9-11 คะแนน = เป็นไวน์ที่ไม่ดี ซึ่งมีลักษณะที่ไม่ดีอย่างน้อย 2 ลักษณะ

0-8 คะแนน = เป็นไวน์ที่รับไม่ได้ มีลักษณะที่ไม่ดีมาก

ภาคผนวก ฉ
ภาพกิจกรรมในระหว่างการดำเนินการ



ภาพผนวกที่ 6 ไร่สับปะรดที่เก็บตัวอย่างมาใช้ในการทดลอง



ภาพผนวกที่ 7 สับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียที่ใช้ในการทดลอง



ภาพผนวกที่ 8 การปอกเปลือกสับปะรด



ภาพผนวกที่ 9 การหั่นผลสับปะรด



ภาพผนวกที่ 10 เนื้อสับปะรดที่ได้จากการหั่น



ภาพผนวกที่ 11 การบีบน้ำสับปะรดด้วยเครื่อง hydraulic press



ภาพผนวกที่ 12 การหมักน้ำสับปะรดในขวดแก้วขนาด 750 มิลลิลิตร



ภาพผนวกที่ 13 สภาวะการหมักไวน์สับปะรดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส



ภาพผนวกที่ 14 การแยกส่วนใสไวน์สับปะรดหลังจากทำการหมัก 15 วัน



ภาพที่ 15 ผลิตภัณฑ์ไวน์จากสับปะรดที่ระดับความสุกแก่ทั้ง 3 ระดับ และยีสต์ 4 สายพันธุ์
ในการหมักไวน์สับปะรด

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวนันทพร เทพแก้ว
วัน เดือน ปี เกิด	21 มิถุนายน 2530
สถานที่เกิด	จังหวัดลำปาง
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	เลขที่ 24 หมู่ที่ 7 ต.เสริมกลาง อ.เสริมงาม จ.ลำปาง 52210
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2537	ประถมศึกษา โรงเรียนวัดนาเอี้ยง จังหวัดลำปาง
พ.ศ. 2543	มัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนเสริมงามวิทยาคม จังหวัดลำปาง
พ.ศ. 2547	มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนเสริมงามวิทยาคม จังหวัดลำปาง
พ.ศ. 2549	ประกาศนียบัตรวิชาชีพชั้นสูง (เทคโนโลยีการอาหาร)
พ.ศ. 2551	ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (อุตสาหกรรมเกษตร) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา ลำปาง

ประสบการณ์

- มีนาคม-เมษายน 2552 ฝึกงานที่ บริษัท เชียงใหม่เฮลตี้โปรดักส์ จำกัด เป็นเวลา 2 เดือน
มีนาคม-เมษายน 2553 ฝึกงานที่ บริษัทซี วาย บออสส์ ฟู้ด จำกัด เป็นเวลา 2 เดือน

ผลงานทางวิชาการ

1. นันทพร เทพแก้ว. 2552. การใช้จุลินทรีย์ผสมในกระบวนการผลิตเครื่องดื่ม น้ำส้มสายชู. ปัญหาพิเศษระดับปริญญาตรี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี การเกษตร, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล ล้านนา ลำปาง. 67 น.
2. Chomsri, N., Chanrittisen, T. and Thepkeaw, N. Production of fermentation vinegar mixed with fruit juice. [On-line]. Available: <http://rescom.rmutl.ac.th/2011/11/29/fermented-vinegar-mixed-with-fruit-juice>

3. Chomsri, N. Chanrittisen, T. and Thepkaew, N. 2010. Fermentation of pineapple juice to vinegar with different Inoculation protocols and its use for beverage production. The 2nd RMUTIC on Science and Technology Development in Creative Economy. Bangkok, Thailand. 24-26 November 2010.
4. Thepkaew, N. and Chomsri, N. 2011. Fermentation of pineapple juice using wine yeasts: kinetics and characteristics. Proceedings of 3rd International Symposium on Tropical Wine. 12-18 November 2011. Chiang Mai, Thailand.
5. Chomsri, N., Chanrittisen, T. and Thepkaew, N. 2011. Fermentation Characteristics of pineapple juice inoculated with mixed yeast cultures. The 3rd RMUTIC on Science and Technology Development in Creative Economy. Chonburi, Thailand. 14-16 December 2011.
6. Chanrittisen, T., Chomsri, N. and Thepkaew, N. 2012. Impact of exogenous tannin and oak chip additions on some organoleptic attributes and chemistry of mulberry wine. International conference on taste and think, integrating sensory evaluation into product development: an Asian perspective (SPISE 2012), HoChiMinh City, July 24-26, 2012.
7. นีลอร์ ไชมศรี ธีรวัลย์ ชาญฤทธิเสน และนันทพร เทพแก้ว. 2555. รายงานฉบับสมบูรณ์ การปรับปรุงคุณภาพและมาตรฐานการผลิตไวน์ผลไม้เพื่อขยายตลาดให้กว้างขึ้น. โครงการพัฒนาศักยภาพผู้ประกอบการ อุทยานวิทยาศาสตร์ภาคเหนือ (อวน.).
8. Chomsri, N., Chanrittisen, T. and Thepkaew, N. 2012. Improvement of appropriate fruit wine production technology for small scale entrepreneur. The Inaugural International Symposium on Local Wisdom and Improving Quality of Life. Chiang Mai Thailand, 8-11 August 2012