โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การพัฒนาเครื่องดื่มชาหมักจากใบองุ่นที่มีสารต้านอนุมูลอิสระสูง

ชื่อนิสิต นางสาวนันท์นภัส พิสิษฐ์อาภาภัค
นางสาวศุภาพิชญ์ ทองรัตน์

ภาควิชา ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร
ปีการศึกษา 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายงานความก้าวหน้าการวิจัย
ภายใต้โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์
ครั้งที่ 3

เรื่อง

การพัฒนาเครื่องดื่มชาหมักจากใบองุ่นที่มีสารต้านอนุมูลอิสระสูง

(Development of a high antioxidant kombucha beverage from grapevine leaves)

โดย

นางสาวนันท์นภัส พิสิษฐ์อาภาภัค

นางสาวศุภาพิชญ์ ทองรัตน์

ประจำปีการศึกษา 2563

ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร

คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การพัฒนาเครื่องดื่มชาหมักจากใบอุ่นที่มีสารต้านอนุมูลอิสระสูง

โดย

นางสาวนันท์นภัส พิสิษฐ์อาภาภัค

นางสาวศุภาพิชญ์ ทองรัตน์

อาจารย์ที่ปรึกษา

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พนิตา งามเชื้อชิต

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิตสาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร

ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประจำปีการศึกษา 2563

Development of a high antioxidant kombucha beverage from grapevine leaves

Nannapat Pisithapapak

Supaphich Thongrat

Project Advisor

Asst. Prof. Panita Ngamchuachit, Ph.D

A Report Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Bachelor of Science Program in Food Technology

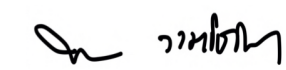
Department of Food Technology Faculty of Science Chulalongkorn University

Academic Year 2020

หัวข้องานวิจัย	การพัฒนาเครื่องดื่มชาหมักจากใบอุ่นที่มีสารต้านอนุมูลอิสระสูง
โดย	นางสาวนันท์นภัส พิสิษฐ์อาภาภัค
	นางสาวศุภาพิชญ์ ทองรัตน์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พนิตา งามเชื้อชิต
ปีการศึกษา	2563

ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
อนุมัติให้รายงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร
ประจำปีการศึกษา 2563

(รองศาสตราจารย์ ดร.ขนิษฐา ธนานุวงศ์)
หัวหน้าภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร



(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พนิตา งามเชื้อชิต)
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

หัวข้องานวิจัย การพัฒนาเครื่องดื่มชาหมักจากใบอุ่นที่มีสารต้านอนุมูลอิสระสูง

โดย นางสาวนันท์นภัส พิสิษฐ์อาภาภัค
นางสาวศุภาพิชญ์ ทองรัตน์
สาขาวิชา เทคโนโลยีทางอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พนิตา งามเชื้อชิต

ปีการศึกษา 2563

บทคัดย่อ

ในปัจจุบันอุตสาหกรรมผลิตไวน์มีความพยายามที่จะลดการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชลง จึงมีการติดตาอุ่นพันธุ์ทางการค้าบนต้นตอขององุ่นป่าที่แข็งแรงเพื่อให้ได้ต้นอุ่นที่ทนต่อศัตรูพืช ซึ่งในการปลูกองุ่นด้วยวิธีนี้มีการทิ้งใบต้นตออุ่นป่าจำนวนมาก ซึ่งใบอุ่นป่ามีสารประกอบฟีนอลและสารต้านอนุมูลอิสระในปริมาณที่สูง งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเครื่องดื่มชาหมักจากใบอุ่นที่มีสารต้านอนุมูลอิสระสูง โดยศึกษาผล Diammonium phosphate (DAP) ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับจุลินทรีย์ต่อการเปลี่ยนแปลงทางเคมีกายภาพ ได้แก่ ค่าความเป็นกรดด่าง (pH), ปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ (tritratable acidity, TA), ปริมาณกรดที่ระเหยได้ (volatile acid), ปริมาณแอลกอฮอล์ และปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่ (residual sugar) ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันและสารประกอบฟีนอลทั้งหมด และลักษณะทางประสาทสัมผัส (ได้แก่ การประเมินประสาทสัมผัสเชิงพรรณนา และความชอบโดยรวม) จากการศึกษาพบว่าตัวอย่างเครื่องดื่มชาหมักจากใบอุ่นที่เติม DAP มีค่า pH, ปริมาณกรดที่ไตเตรตได้, ปริมาณกรดที่ระเหยได้, ปริมาณแอลกอฮอล์ และ ปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่แตกต่างจากเครื่องดื่มชาหมักที่ไม่เติม DAP อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ส่วนฤทธิ์การต้านออกซิเดชันและสารประกอบฟีนอลทั้งหมดพบว่าไม่มีความแตกต่างระหว่างชาใบอุ่นก่อนการหมักและหลังการหมัก ($p > 0.05$) และจากการประเมินความชอบของผู้ทดสอบ (9-point hedonic) ต่อชาหมัก 5 ตัวอย่างได้แก่ ชาหมักจากใบอุ่นที่เติม DAP และไม่เติม DAP, ชาหมักจากชาดำ และ ชาหมักในท้องตลาด A และ B พบว่าผู้ทดสอบให้การยอมรับทั้งห้าตัวอย่าง (คะแนนมากกว่า 5) โดยผู้ทดสอบชอบชาหมักในท้องตลาดมากที่สุดทั้งในด้านกลิ่น รสชาติและลักษณะปรากฏ จากการประเมินคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสเชิงพรรณนาพบว่าชาหมักในท้องตลาดมีความเข้มของกลิ่นน้ำส้มสายชูและกลิ่นหมักที่ต่ำกว่า และมีกลิ่นหวานที่สูงกว่าตัวอย่างชาหมักจากใบอุ่นและชาหมักจากชาดำจึงสามารถใช้ข้อมูลลักษณะทางประสาทสัมผัสนี้ในการพัฒนาเครื่องดื่มชาหมักให้ตรงความต้องการของผู้บริโภคต่อไป

Project Title	Development of a high antioxidant kombucha beverage from grapevine leaves
Student	Nannapat Pisithapapak
	Supaphich Thongrat
Study Program	Bachelor of Science in Food Technoligy
Advisor	Asst. Prof. Panita Ngamchuachit, Ph.D.
Acedemic Year	2020

Abstract

Nowadays, wine-making industry try to reduce the use of insecticide in vineyard. Bud grafting of the commercial grape varieties to a rootstock from wild variety is a method to improve greater plant resistance to insect. However, grapevine leaves become the agricultural waste from vineyard. Grapevine leaves have a rich in phenolic and bioactive compounds. The aim of this project is to develop a high antioxidant kombucha beverage from grapevine leaves. Three types of kombucha fermented tea from grapevine leaves with and without diammonium phosphate and from black tea leaves were produced in order to study and compare the changes of biological and chemical parameter during the process of the fermentation and compare phenolic content and antioxidant capacity between the initial and the final products. The parameters include, pH, titratable acidity (TA), volatile acid (VA), alcohol content, residual sugar. Phenolic compounds were analyzed using Folin-Ciocalteu method. The scavenging abilities of DPPH were analyzed using ascorbic acid as standard reagent. The result showed that kombucha from grapevine leaves with and without diammonium phosphate and black tea leaves have significant difference in pH, TA, VA, alcohol content and RS. Furthermore, kombucha from grapevine leaves with diammonium phosphate contain higher amount in pH, TA, VA, alcohol content and RS. On the other hand, there were no significant difference ($p > 0.05$) in phenolic content and the scavenging of DPPH between the initial and the final products. From the acceptability test using 9-point hedonic scaling and descriptive analysis of 5 samples kombucha which include kombucha from grapevine leaves with and without diammonium phosphate, kombucha from black tea, kombucha A and B from the market have showed that kombucha from market have a lower intensity of acetic aroma and fermented aroma but have higher intensity of sweet aroma. However, all of the kombucha samples have been accepted by the panelist

กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของการเรียนการสอนตามหลักสูตรในระดับปริญญาบัณฑิตของภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งได้รับทุนอุดหนุนจากงบประมาณของโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ปีการศึกษา 2563 คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. พนิตา งามเชื้อชิต อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ที่ได้ให้ข้อแนะนำ ข้อเสนอแนะรวมทั้งความช่วยเหลือต่าง ๆ อันเป็นประโยชน์แก่งานวิจัยมาโดยตลอด

ขอขอบคุณ บริษัท สยามไวเนอรี จำกัด ที่สนับสนุนทุนในการพัฒนาผลิตภัณฑ์และงานวิจัย รวมถึงสนับสนุนวัตถุดิบในงานวิจัย

ขอขอบคุณ คุณศุภเชษฐ์ สะสมสิน (Deputy Director Innovation and Winemaking) รวมถึงพี่ในแผนก Innovation และแผนกควบคุมคุณภาพทุกท่านที่ช่วยให้คำปรึกษางานวิจัยและให้คำแนะนำวิธีการตรวจวิเคราะห์ รวมถึงสนับสนุนสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

ขอขอบคุณหัวหน้าห้องปฏิบัติการ บุคลากร และเพื่อนนิสิตในภาควิชา ที่อำนวยความสะดวกและให้ความช่วยเหลือทุกด้านจนงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้คณะผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่างานนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องต่อไปในอนาคต

นันท์นภัส พิสิษฐ์อาภาภัค

ศุภาพิชญ์ ทองรัตน์

สารบัญ

		หน้า
บทที่ 1 บทนำ		1
1.1.	ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
1.2.	วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3.	ขอบเขตงานวิจัย	2
1.4.	ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 วารสารปริทัศน์		3
2.1.	องุ่นป่า	3
2.2.	ของเหลือจากอุตสาหกรรมไวน์	5
2.2.1.	กากองุ่น	5
2.2.2.	ใบองุ่น	5
2.3.	Kombucha	5
2.3.1.	SCOBY	7
2.3.2.	วัตถุดิบที่ใช้ในการหมัก	8
2.3.3.	วิธีการหมัก Kombucha	8
2.4.	สารประกอบฟีนอล	8
2.5.	สารต้านอนุมูลอิสระ	9
2.5.1.	ประเภทของสารต้านอนุมูลอิสระ	10
2.6.	การวิเคราะห์สมบัติการต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH	10
2.7.	ปัจจัยที่จำเป็นต่อการเจริญของยีสต์	11
บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินงานวิจัย		12
3.1.	วัตถุดิบ	12
3.2.	สารเคมี	12
3.3.	เครื่องมือ	13
3.3.1.	วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมใบองุ่น	13
3.3.2.	วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะทางเคมี	13
3.4.	ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย	13
3.4.1.	การเตรียมตัวอย่างใบองุ่น	13
3.4.2.	การหมักชาหมัก	13
3.4.3.	การสกัดชาใบองุ่นและเครื่องดื่มชาหมักเพื่อวิเคราะห์สารประกอบฟีนอล	14
3.4.4.	การวิเคราะห์ปริมาณกรดที่ไตเตรตได้ (Titratable acidity, TA)	14

3.4.5. การวิเคราะห์ปริมาณกรดที่ระเหยได้ (Volatile acid, VA) 14
3.4.6. การวัดร้อยละของปริมาณแอลกอฮอล์ 14
3.4.7. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่ (Residual sugar, RS) 15
3.4.8. การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH 15
3.4.9. การวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric 15
3.4.10. การทดสอบทางประสาทสัมผัส 15
3.4.11. การวิเคราะห์ทางสถิติ 15
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ 16
4.1. ปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่ (Residual sugar, RS) 16
4.2. ปริมาณแอลกอฮอล์ 17
4.3. pH 18
4.4. ปริมาณกรดที่ไตเตรตได้ (Titratable acid, TA) 19
4.5. ปริมาณกรดที่ระเหยได้ (Volatile acid, VA) 19
4.6. สารประกอบฟีนอลทั้งหมด 20
4.7. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 21
4.8. การทดสอบทางประสาทสัมผัส 21

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	24
5.1. สรุปผลการทดลอง	24
5.2. ข้อเสนอแนะ	24
บรรณานุกรม	25
ภาคผนวก	28
ภาคผนวก ก แบบทดสอบทางประสาทสัมผัส โดยวิธี 9-Point Hedonic Scale	29
ภาคผนวก ข แบบทดสอบคุณลักษณะทางประสาทสัมผัส	30
ภาคผนวก ค ผลการทดสอบการยอมรับของเครื่องดื่มชาหมัก	31
ภาคผนวก ง ผลการทดสอบคุณลักษณะทางประสาทสัมผัส	33
ภาคผนวก จ ผลวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	35
ภาคผนวก ฉ กราฟมาตรฐาน	41
ประวัติผู้วิจัย	43

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ ค-1 ผลการยอมรับด้านกลิ่น acetic ของเครื่องดื่มชาหมัก 31
ตารางที่ ค-2 ผลการยอมรับด้านลักษณะปรากฏ ของเครื่องดื่มชาหมัก 31
ตารางที่ ค-3 ผลการยอมรับด้านรสชาติ ของเครื่องดื่มชาหมัก 32
ตารางที่ ค-4 ผลการยอมรับด้านความชอบโดยรวม ของเครื่องดื่มชาหมัก 32
ตารางที่ ง-1 ผลการทดสอบคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่น acetic ของเครื่องดื่มชาหมัก 33
ตารางที่ ง-2 ผลการทดสอบคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นหมักของเครื่องดื่มชาหมัก 33
ตารางที่ ง-3 ผลการทดสอบคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นหวานของเครื่องดื่มชาหมัก 33
ตารางที่ ง-4 ผลการทดสอบคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นชาของเครื่องดื่มชาหมัก 34
ตารางที่ ง-5 ผลการทดสอบคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสด้านรสเปรี้ยวของเครื่องดื่มชาหมัก 34
ตารางที่ ง-6 ผลการทดสอบคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสด้านรสหวานของเครื่องดื่มชาหมัก 34
ตารางที่ จ-1 ผลการวิเคราะห์วิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่ในเครื่องดื่มชาหมักที่เติมและไม่เติม DAP (วันที่ 1 ถึงวันที่ 21) 35
ตารางที่ จ-2 ผลการวิเคราะห์วิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณแอลกอฮอล์อยู่ในเครื่องดื่มชาหมักที่เติมและไม่เติม DAP (วันที่ 1 ถึงวันที่ 21) 35
ตารางที่ จ-3 ผลการวิเคราะห์วิเคราะห์ความแปรปรวนของ pH ในเครื่องดื่มชาหมักที่เติมและไม่เติม DAP (วันที่ 1 ถึงวันที่ 21) 35
ตารางที่ จ-4 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ในเครื่องดื่มชาหมักที่เติมและไม่เติม DAP (วันที่ 1 ถึงวันที่ 21) 36
ตารางที่ จ-5 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรดแอซิติกได้ในเครื่องดื่มชาหมักที่เติมและไม่เติม DAP (วันที่ 1 ถึงวันที่ 21) 36
ตารางที่ จ-6 ผลทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดในเครื่องดื่มชาหมักที่เติม DAP ก่อนและหลังการหมัก 36
ตารางที่ จ-7 ผลทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดในเครื่องดื่มชาหมักที่ไม่เติม DAP ก่อนและหลังการหมัก 37
ตารางที่ จ-8 ผลทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในเครื่องดื่มชาหมักที่เติม DAP ก่อนและหลังการหมัก 37
ตารางที่ จ-9 ผลทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในเครื่องดื่มชาหมักที่ไม่เติม DAP ก่อนและหลังการหมัก 37

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่ จ-10 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยคะแนนการยอมรับด้านความชอบโดยรวม ของเครื่องดื่มชาหมักที่เติมและไม่เติม DAP, เครื่องดื่มชาหมักจากชาดำ, เครื่องดื่มชาหมักจากท้องตลาดยี่ห้อ A และ B 37
ตารางที่ จ-11 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยคะแนนการยอมรับด้านลักษณะปรากฏ ของเครื่องดื่มชาหมักที่เติมและไม่เติม DAP, เครื่องดื่มชาหมักจากชาดำ, เครื่องดื่มชาหมักจากท้องตลาดยี่ห้อ A และ B 38
ตารางที่ จ-12 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยคะแนนการยอมรับด้านกลิ่น ของเครื่องดื่มชาหมักที่เติมและไม่เติม DAP, เครื่องดื่มชาหมักจากชาดำ, เครื่องดื่มชาหมักจากท้องตลาดยี่ห้อ A และ B 38
ตารางที่ จ-13 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยคะแนนการยอมรับด้านรส ของเครื่องดื่มชาหมักที่เติมและไม่เติม DAP, เครื่องดื่มชาหมักจากชาดำ, เครื่องดื่มชาหมักจากท้องตลาดยี่ห้อ A และ B 38
ตารางที่ จ-14 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นกรดน้ำส้มของเครื่องดื่มชาหมักที่เติมและไม่เติม DAP, เครื่องดื่มชาหมักจากชาดำ, เครื่องดื่มชาหมักจากท้องตลาดยี่ห้อ A และ B 39
ตารางที่ จ-15 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นหมักของเครื่องดื่มชาหมักที่เติมและไม่เติม DAP, เครื่องดื่มชาหมักจากชาดำ, เครื่องดื่มชาหมักจากท้องตลาดยี่ห้อ A และ B 39
ตารางที่ จ-16 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นหวานของเครื่องดื่มชาหมักที่เติมและไม่เติม DAP, เครื่องดื่มชาหมักจากชาดำ, เครื่องดื่มชาหมักจากท้องตลาดยี่ห้อ A และ B 39
ตารางที่ จ-17 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสด้านรสเปรี้ยวของเครื่องดื่มชาหมักที่เติมและไม่เติม DAP, เครื่องดื่มชาหมักจากชาดำ, เครื่องดื่มชาหมักจากท้องตลาดยี่ห้อ A และ B 40
ตารางที่ จ-18 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสด้านรสหวานของเครื่องดื่มชาหมักที่เติมและไม่เติม DAP, เครื่องดื่มชาหมักจากชาดำ, เครื่องดื่มชาหมักจากท้องตลาดยี่ห้อ A และ B 40
ตารางที่ จ-19 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นชาของเครื่องดื่มชาหมักที่เติมและไม่เติม DAP, เครื่องดื่มชาหมักจากชาดำ, เครื่องดื่มชาหมักจากท้องตลาดยี่ห้อ A และ B 40

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 2.1 ลักษณะตอกิ่ง 4

ภาพที่ 2.2 ลักษณะใบองุ่น (ที่มา: ชุมชนคนรักพรรณไม้) 4

ภาพที่ 2.3 ลักษณะผลองุ่น (ที่มา: ชุมชนคนรักพรรณไม้) 5

ภาพที่ 2.4 แสดงลักษณะของเครื่องดื่ม Kombucha 6

ภาพที่ 2.5 ลักษณะ SCOBY 7

ภาพที่ 4.1 Residual sugar ของเครื่องดื่มชาหมักจากใบองุ่นที่เติมและไม่เติม DAP และชาหมักจากชาดำ (Black tea) ตลอดกระบวนการหมัก 21 วัน 16

ภาพที่ 4.2 ร้อยละแอลกอฮอล์ของเครื่องดื่มชาหมักจากใบองุ่นที่เติมและไม่เติม DAP และชาหมักจากชาดำ (Black tea) ตลอดกระบวนการหมัก 21 วัน 17

ภาพที่ 4.3 ค่า pH ของเครื่องดื่มชาหมักจากใบองุ่นที่เติมและไม่เติม DAP และชาหมักจากชาดำ (Black tea) ตลอดกระบวนการหมัก 21 วัน 18

ภาพที่ 4.4 ปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ของเครื่องดื่มชาหมักจากใบองุ่นที่เติมและไม่เติม DAP และชาหมักจากชาดำ (Black tea) ตลอดกระบวนการหมัก 21 วัน 19

ภาพที่ 4.5 ปริมาณกรดอะซิติกของเครื่องดื่มชาหมักจากใบองุ่นที่เติมและไม่เติม DAP และชาหมักจากชาดำ (Black tea) ตลอดกระบวนการหมัก 21 วัน 20

ภาพที่ 4.6 ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดของเครื่องดื่มชาหมักจากใบองุ่นที่เติมและไม่เติม DAP และชาหมักจากชาดำ (Black tea) ในวันที่ 1 และวันที่ 21 ของการหมัก 20

ภาพที่ 4.7 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเครื่องดื่มชาหมักจากใบองุ่นที่เติมและไม่เติม DAP และชาหมักจากชาดำ (Black tea) ในวันที่ 1 และวันที่ 21 ของการหมัก 21

ภาพที่ 4.8 ผลการทดสอบการยอมรับของเครื่องดื่มชาหมักที่เติม DAP, ไม่เติม DAP, ชาหมักที่หมักจากชาดำ ชาหมักจากท้องตลาดยี่ห้อ A และ B 22

ภาพที่ 4.9 คุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของเครื่องดื่มชาหมักที่เติม DAP, ไม่เติม DAP, เครื่องดื่มชาหมักจากชาดำ, เครื่องดื่มชาหมักยี่ห้อ A และ B 23

ภาพที่ 4.10 ภาพเครื่องดื่มชาหมักจากใบองุ่นที่เติมและไม่เติม DAP, เครื่องดื่มชาหมักจาชาดำ, เครื่องดื่มชาหมักจากท้องตลาดยี่ห้อ A และ เครื่องดื่มชาหมักจากท้องตลาดยี่ห้อ B 23

ภาพที่ ฉ-1 กราฟมาตรฐานปริมาณความเข้มข้นของ Ascorbic acid (mM) ในการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของชาก่อนเข้าสู่กระบวนการหมัก 41

ภาพที่ ฉ-2 กราฟมาตรฐานปริมาณความเข้มข้นของ Ascorbic acid (mM) ในการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของชาหมัก 41

ภาพที่ ฉ-3 ภาพแสดงกราฟมาตรฐานปริมาณความเข้มข้นของ Gallic acid (ppm) ในการวิเคราะห์หาปริมาณของสารประกอบฟีนอลทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu ของชาก่อนเข้าสู่กระบวนการหมัก 42
ภาพที่ ฉ-4 กราฟมาตรฐานกราฟมาตรฐานปริมาณความเข้มข้นของ Gallic acid (ppm) ในการวิเคราะห์หาปริมาณของสารประกอบฟีนอลทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu ของชาหมัก 42

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

องุ่นเป็นพืชยืนต้นจัดอยู่ในวงศ์ *Vitaccae* มีลักษณะเป็นไม้พุ่มเลื้อยที่ปลูกกันอย่างแพร่หลายในปัจจุบันได้มีการส่งเสริมให้เกษตรกรทำการเพาะปลูกองุ่นด้วยการเกษตรแบบยั่งยืนและลดการใช้สารเคมีในการเกษตร การปลูกต้นองุ่นจึงจำเป็นต้องใช้ต้นตอขององุ่นป่าและติดตาด้วยองุ่นชนิดที่ปลูกเพื่อใช้ผลรับประทานพันธุ์ที่ต้องการ เพื่อให้สามารถทนต่อแมลงและสภาพภูมิศาสตร์ โดยเมื่อองุ่นป่าโตระดับหนึ่งต้องตัดส่วนอื่นออกทั้งหมดให้เหลือแต่ต้นตอ ทำให้ใบองุ่นป่าเป็นของเหลือทางการเกษตรซึ่ง Ryszard Amarowicz และคณะ (2008) พบว่าในใบองุ่นเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระ และสารประกอบฟีนอล ได้แก่ catechin, epicatechin, gallic acid, vanillic acid และ caffeic acid เป็นต้น) และคณะ (2016) catechin, epicatechin, gallic acid, vanillic acid 5 พันธุ์ ได้แก่ และ caffeic acid เป็นต้น) Farhadi, K และคณะ (2016) รายงานปริมาณสารประกอบฟีนอลและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของส่วนต่างๆของต้นองุ่น 5 พันธุ์ ได้แก่ เปลือก, เนื้อ, เมล็ด, ลำต้น และใบ จากงานวิจัยพบว่าใบองุ่นมีปริมาณของสาร ดังกล่าวน้อยกว่าส่วนอื่น ๆ อย่างไรก็ตามยังไม่มีผู้นำใบองุ่นมาเป็นวัตถุดิบผลิตอาหารในระดับอุตสาหกรรม การนำใบองุ่นมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์อาหารและเครื่องดื่มจึงเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับของเหลือจากการเกษตรและอุตสาหกรรม

Kombucha เป็นเครื่องดื่มที่ทำจากใบชา ไร้แอลกอฮอล์ มีความหวานและเปรี้ยวซ่า จากการหมักโดยยีสต์และแบคทีเรียได้รับความนิยมอย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีประโยชน์ต่อสุขภาพ (Quito-Won M.E., and Teues F.G., 2018) เป็นเครื่องดื่มที่มีทั้งโพรไบโอติกและพรีไบโอติก รวมถึงกรดอินทรีย์ วิตามิน และแร่ธาตุ คุณประโยชน์จาก Kombucha มาจากทั้งวัตถุดิบเริ่มต้น (เช่น ใบชา หรือ สมุนไพรต่างๆ) และจากผลผลิตจากการหมักจำพวกกรดอินทรีย์ (เช่น gluconic acid, acetic acid, glucuronic acid, lactic acid และ citric acid) กรดไขมันสายสั้น (short chain fatty acids, SCFAs) และสารเมแทบอไลท์ต่างๆ อีกด้วย เครื่องดื่ม Kombucha จึงเหมาะสำหรับผู้กลุ่มบริโภคที่ใส่ใจสุขภาพ ผู้แพ้ผลิตภัณฑ์จากนมวัว และกลุ่มผู้บริโภคอาหารมังสวิรัติได้เป็นอย่างดี ปัจจุบันการผลิตเครื่องดื่ม Kombucha นอกจากจะมีการนำใบชามาใช้ในการหมักแล้วยังมีการนำ mint, lemon balm, และ jasmine มาใช้เป็นวัตถุดิบเริ่มต้น (Martinez Leal, J., et al., 2018) แต่ยังไม่มีการนำใบองุ่นมาใช้เป็นวัตถุดิบในการทำเครื่องดื่มชาหมัก งานวิจัยนี้ได้ศึกษาและพัฒนาเครื่องดื่มชาหมักจากใบองุ่นที่เหลือจากการปลูกองุ่นเพื่อผลิตไวน์ เพื่อเป็นการสร้างคุณค่าให้แก่ใบองุ่นและพัฒนากระบวนการผลิตเครื่องดื่มชาหมักให้ได้กลิ่นและรสชาติที่ดี รวมถึงมีประโยชน์ต่อสุขภาพของผู้บริโภค

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1) เพื่อศึกษาและพัฒนากระบวนการหมักเครื่องดื่มชาหมัก (kombucha) จากใบอุ่น
2) เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบสมบัติทางเคมีกายภาพและทางประสาทสัมผัส และปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดก่อนกระบวนการหมักและหลังกระบวนการหมักเครื่องดื่มชาหมัก
3) เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระก่อนกระบวนการหมักและหลังกระบวนการหมักเครื่องดื่มชาหมัก

1.3 ขอบเขตการวิจัย

1) ศึกษาผลของไดแอมโมเนียมฟอสเฟตต่อกระบวนการหมักและการยอมรับทางประสาทสัมผัสของเครื่องดื่มชาหมักจากใบอุ่น
2) ศึกษาเกี่ยวกับการวิเคราะห์สมบัติทางเคมีกายภาพและทางประสาทสัมผัส ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์การต้านอนุมลอิสระระหว่างกระบวนการหมัก

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) สามารถพัฒนากระบวนการหมักเครื่องดื่มชาหมักจากใบอุ่น
2) ทราบการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางเคมีกายภาพและทางประสาทสัมผัส ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์การต้านอนุมลอิสระระหว่างกระบวนการหมัก

บทที่ 2
วารสารปริทัศน์

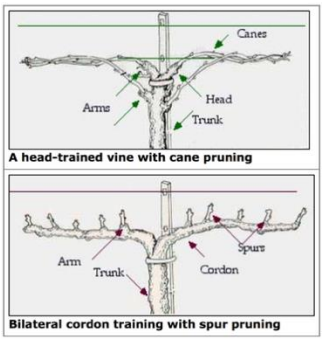
2.1 องุ่นป่า

องุ่นป่าเป็นพืชเขตร้อนสามารถพบได้ในประเทศไทย, เวียดนาม, แคมโบเดีย, สาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว, เพนนินซูล่า มาเลเซีย, บอร์เนียว และ ฟิลิปปินส์ นิยมนำมาใช้ประโยชน์ในการแพทย์พื้นบ้านในประเทศไทยและมีการศึกษาซึ่งพบว่าสารประกอบฟีนอลและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดในเมล็ดองุ่นป่าสีเขียว สีแดง และสีดำตามลำดับ (Thonpho, A. et al., 2019)

- ชื่อวิทยาศาสตร์: *Ampelocissus martini* Planch
- ชื่อพื้นเมือง: เครืออีโกย, อีโก่ย (นครราชสีมา); กุ่ย (อุบลราชธานี); เถาเปรี้ยว (กรุงเทพ) เถาวัลย์ขน (ราชบุรี); ส้มกุ้ง (ประจวบคีรีขันธ์ นครศรีธรรมราช); ส้มกุ่ย (สระบุรี); ส้มออบ (นครศรีธรรมราช)
- ชื่อพ้อง: *Vitis martinii* (Planch.)
- ชื่อวงศ์: *Vitaceae*
- แหล่งที่พบ: ป่าเต็งรัง เบญจพรรณ ป่าผลัดใบ
- สภาพแวดล้อมที่เหมาะสม: แสงแดดปานกลาง เจริญได้ดีในดินเกือบทุกชนิด
- ส่วนที่ใช้เป็นอาหาร ยอดอ่อนมีรสเปรี้ยวนำมาปรุงอาหารได้ ผลสุกสีดำรับประทานได้ โดยนำผลสุกมาตำรวมกับผลไม้รสฝาดเพื่อลดอาการระคายเคืองเวลารับประทาน รากมีประโยชน์ทางยาใช้ฝนน้ำดื่มแก้ไข้ ต้มน้ำดื่มแก้ฝี รักษาอาการบวม
- การขยายพันธุ์: เพาะเมล็ด
- ลักษณะทางพฤกศาสตร์: ไม้เถาเลื้อย มีมือเกาะตามข้อ เถาเป็นปล้อง กิ่งและยอดอ่อนมีขนสีน้ำตาลปกคลุม เถาแก่สีน้ำตาลแดง มีความแข็งและมีเนื้อไม้

- ตอกิ่ง (arms)

เป็นกิ่งที่แตกออกจากลำต้น (head training) หรือแตกออกมาจากคอร์ดอน (cordon training) เมื่อแก่จะถูกตัดให้สั้นเหลือเพียง 1-2 ตา เมื่อแตกตาเป็นยอดอ่อนจะเรียกว่า กิ่งอ่อน (shoot) และเมื่อแก่เรียกว่า เคน (cane)



ภาพที่ 2.1 ลักษณะตอกิ่ง (ที่มา: https://www.cartographwines.com)

- **ใบ (leaf)**

ลักษณะใบแบน รูปหัวใจ มีเส้นใบ 5 เส้น ออกมาจากก้านใบ ใบอ่อนมีขนปกคลุม ขอบใบมีลักษณะคล้ายฟันเลื่อย (secretion) มีส่วนเว้าที่โคนใบเรียกว่าไซนัส (sinus) ขอบใบเว้าเป็น 3 - 5 แฉก ใบมีความกว้างประมาณ 10 – 13.5 เซนติเมตร ยาวประมาณ 12 เซนติเมตร

ภาพที่ 2.2 ลักษณะใบองุ่น (ที่มา: ชุมชนคนรักพรรณไม้ (ที่มา: https://m.facebook.com/story.php?story_fbid=1821888424500174&id=439714696050894)

- **ดอกช่อ**

ออกตรงข้ามกับใบและโคนเถา ยาวประมาณ 7.5 เซนติเมตร โดยเถาที่ออกดอกและติดผลใบจะร่วงหมด ดอกย่อยมีจำนวนมาก มีขนาดเล็ก กลีบรวมสีชมพู กลางดอกสีแดงเข้ม เกสรตัวผู้มี 5 อัน เกสรตัวเมียอยู่เหนือวงกลีบ

- **ผลสด**

เป็นรูปทรงกลม เป็นพวงแน่น เส้นผ่านศูนย์กลางผล 2-3 เซนติเมตร ผลอ่อนสีเขียว เมื่อสุกมีสีแดงคล้ำ

ภาพที่ 2.3 ลักษณะผลองุ่น
(ที่มา: https://m.facebook.com/story.php?story_fbid
=1821888424500174&id=439714696050894)

2.2 ของเหลือจากอุตสาหกรรมไวน์

2.2.1 กากองุ่น (Grape pomace)

เป็นส่วนที่เหลือจากการคั้นน้ำเพื่อทำไวน์ และน้ำองุ่น ประกอบด้วยเปลือกและเมล็ด คิดเป็นร้อยละ 20 ของน้ำหนัก โดยกากองุ่น 1 กิโลกรัม เป็นส่วนที่เหลือจากการผลิตไวน์ 6 ลิตร ในแต่ละปีมีปริมาณกากองุ่นทั่วโลก 10.5 – 13.1 ล้านตัน (Dávila, I. et al, 2017)

2.2.2 ใบองุ่น (Grapevine leaves)

ในปัจจุบันอุตสาหกรรมผลิตไวน์มีความพยายามที่จะลดการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชลง จึงมีการติดตาองุ่นพันธุ์ทางการค้าบนต้นตอขององุ่นป่าที่แข็งแรงเพื่อให้ได้ต้นองุ่นที่ทนต่อศัตรูพืช ซึ่งในการปลูกองุ่นด้วยวิธีนี้มีการทิ้งใบต้นตอองุ่นป่าจำนวนมากใบองุ่นจึงกลายเป็นของเสียทางการเกษตร ในการปลูกองุ่นได้มีการใช้ต้นตอองุ่นป่าเนื่องจากมีการแพร่ระบาดของ เพลี้ย Phylloxera ที่เข้าทำลายที่ใบและรากขององุ่นในยุโรป และในประเทศไทยพบการระบาดของไส้เดือนฝอยที่เข้าทำลายระบบรากองุ่น โดยอาศัยอยู่ภายในราก ทำให้รากเป็นปม ทำให้ผลผลิตต่ำ ต้นตอจะช่วยให้องุ่นมีระบบรากที่แข็งแรงต้านทานต่อโรคและไส้เดือนฝอยรวมถึงสภาพดินไม่เหมาะสม แต่ควรเลือกพันธุ์ต้นตอให้เหมาะสมกับสภาพดินและปัญหาของพื้นที่นั้น ๆ ด้วย (จิระนิล แจ่มเกิด, 2563)

2.3 Kombucha

เครื่องดื่มชาหมัก (Kombucha) (ภาพที่ 2.4) ชาหมักมีต้นกำเนิดมาจากประเทศในแถบเอเชียตะวันออก มากว่า 2,000 ปี โดยการนำชาดำมาต้มและน้ำตาล และหมักด้วยยีสต์และแบคทีเรีย (symbiotic culture of bacteria and yeast, SCOBY) โดยแบคทีเรียผลิตกรดน้ำส้ม เช่น *komagateibacter xylinum, Acetobacter xylinoides* และ *Gluconobacter oxydan* เป็นต้น

จะสร้างชั้นเซลลูโลส มีลักษณะเป็นแผ่นสีครีมลอยอยู่ โดยจะมียีสต์ที่อยู่ร่วมกับแบคทีเรียผลิตกรดน้ำส้มแบบ symbiosis เช่น *Saccharomyces sp., Shizosaccharomyces pombe* และ *Zygosaccharomyces kombuchaensis Torulaspora delbrueckii* เป็นต้น ใบชาที่นำมาส่วนใหญ่ประกอบด้วย ฟลาโวนอยด์ กรดอะมิโน กรดฟีนอลิก เมื่อนำมาหมักกับน้ำตาลซูโครสและแบคทีเรียดังกล่าว ยีสต์จะผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทสย่อยน้ำตาลซูโครส และนำน้ำตาลกลูโครสและฟรุกโทสไปหมักได้เป็นเอทานอลซึ่งต่อมาถูกแบคทีเรียจะออกซิไดซ์ ให้เอทานอลกลายเป็นกรดอินทรีย์ เช่น กลูคูโรนิกและอะซิติก และยังได้สารเมทาบอไลท์อื่น ๆ เช่น วิตามินซี, บี 1, บี 2 และบี 12 รวมถึงมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียที่ปนเปื้อนได้ โดยใช้ระยะเวลาในการหมัก 21 วัน (Sievers et al., 1995) เริ่มต้นจะมีรสชาติหวานและเปรี้ยวซ่าคล้ายแอปเปิลไซเดอร์ และเมื่อหมักระยะเวลานานขึ้นจะให้รสชาติคล้ายน้ำส้มสายชู หลังจากที่ยีสต์และแบคทีเรียเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็น ethanol และกรด ทำให้ช่วยยืดอายุเครื่องดื่มชาหมักให้สามารถเก็บไว้ได้นาน (Dutta,H & Paul, S.K., 2019)

Kombucha เป็นเครื่องดื่มที่มีประโยชน์ในการป้องกันการเสื่อมของระบบประสาท ลดความดันหลอดเลือด มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ รักษาระดับน้ำตาลในเลือด รวมถึงมีความสามารถในการกำจัดสารพิษและป้องกันมะเร็งอีกด้วย ในระหว่างกระบวนการหมักแบคทีเรียจะสร้างเซลลูโลสขึ้นเป็นไบโอฟิล์มลอยอยู่บนผิวหน้าของเครื่องดื่มในภาชนะหมัก หลังจาก 7-14 วัน ชั้นไบโอฟิล์มจะหนาขึ้น ปัจจัยที่มีผลต่อจลนพลศาสตร์ของการหมักคือ อุณหภูมิ, ค่าความเป็นกรดด่าง, การละลายของออกซิเจน, ชนิดของน้ำตาล, ระยะเวลาในการหมัก, เส้นผ่านศูนย์กลางของภาชนะหมัก (Villarreal-Soto, S.A. et al., 2019)

ภาพที่ 2.4 แสดงลักษณะของเครื่องดื่ม Kombucha
(ที่มา: https://healthytearoom.com/make-kombucha-home)

2.3.1) SCOBY

Scoby หรือ symbiosis of yeast and bacteria ซึ่งเป็นหัวเชื้อสำหรับหมัก มีลักษณะเป็นเซลลูโลสลอยอยู่บนของเหลวในภาชนะหมัก(ภาพที่ 2.5) จุลินทรีย์ที่ตรวจพบโดยทั่วไปได้แก่ *Acetobacter xylinoides, komagateibacter xylinus, Gluconacetobacter xylinus, Acetobacter aceti, Acetobacter pasteurianus, Schizosaccharomyces pombe, Saccharomycodes ludwigii, Kloeckera apiculata, Saccharomyces cerevisiae, Torulaspora, Zygosaccharomyces bailii, Brettanomyces bruxellensis, Brettanomyces lambicus, Brettanomyces custersii*, *Candida*, และ *Pichia species* (Zhang et al., 2011; Yamada et al., 2012) โดยในระหว่างกระบวนการหมักจะมีการผลิตสาร intermediate และ secondary metabolites ที่มีประโยชน์ โดยขั้นแรก acetic acid bacteria จะเปลี่ยนน้ำตาลและแอลกอฮอล์ให้ได้ออกมาเป็นกรดอินทรีย์ เช่น acetic, malic, lactic และ succinic ส่วน Gluconoacetobacter และ Komagateibacter สามารถผลิต cellulose, gluconic และ glucolonic acid จากปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยเอนไซม์ glucose dehydrogenase โดยขึ้นอยู่กับปริมาณของแหล่งไนโตรเจน ความสามารถในการต้านแรงดันออสโมติก และ การทนต่อเอทานอลของจุลินทรีย์ (Villarreal-Soto, S.A. et al., 2020) ยีสต์ใน SCOBY จะไฮโดรไลซ์ sucrose เป็น glucose และ fructose โดยเอนไซม์ invertaseและมีการผลิต ethanol ร่วมด้วย ส่วน acetic bacteria จะเปลี่ยน glucose และ ethanol เป็น gluconic acid และ acetic acid ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีการผลิต glucorunic acid ซึ่งได้จากการออกซิเดชัน glucose และอาจมี lactic acid ที่มาจากการเปลี่ยน glucose และ sucrose โดย lactic acid bacteria มีปัจจัยหลายอย่างที่ส่งผลต่อการผลิตสารเมทาบอไลท์ในระหว่างกระบวนการหมัก เช่น วัตถุดิบที่ใช้, ค่าความเป็นกรดด่าง, อุณหภูมิ และระยะเวลาในการหมัก นอกจากปัจจัยดังกล่าวแล้ว SCOBY ก็ถือเป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งที่มีผลต่อการผลิตสารเมทาบอไลท์ระหว่างกระบวนการหมัก เนื่องจาก SCOBY ที่มาจากแหล่งพื้นที่ต่างกันก็จะมีชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ที่แตกต่างกันด้วย (Dufresne and Farnworth, 2000)

ภาพที่ 2.5 ลักษณะ SCOBY (ที่มา: https://happykombucha.co.uk)

2.3.2) วัตถุดิบที่ใช้ในการหมัก

วัตถุดิบที่นิยมใช้ในการหมักคือชาดำและชาเขียวซึ่งการใช้วัตถุดิบต่างกันจะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงกรดอินทรี เช่น acetic, lactic gluconic, glucoronic acid และ สารประกอบฟีนอลในกลุ่ม catechins ที่แตกต่างกันด้วย (Jayabalan et al., 2007) นอกจากนี้ยังมีการนำวัตถุดิบอื่น ๆ ซึ่งเป็นวัตถุดิบทางเลือกมาใช้ในกระบวนการหมัก เช่น หญ้าหวาน น้ำมะพร้าว ใบโอ๊ก เปเปอร์มินท์ โรสแมร์รี่ ไทม์ เปลือกกล้วย เลมอนด์บาล์ม และนม เป็นต้น ซึ่งวัตถุดิบแต่ละชนิดจะมีสารที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระและการต้านจุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน ส่วนน้ำตาลที่ใช้นิยมใช้ ได้แก่ ซูโครส น้ำผึ้ง และ กากน้ำตาล (molasses) เป็นต้น น้ำตาลแต่ละชนิดจะทำให้จุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันและให้รสชาติ รวมถึงส่งผลให้ต้นทุนในกระบวนการหมักแตกต่างกันด้วย (Dutta,H & Paul, S.K., 2019)

2.3.3) วิธีการหมัก Kombucha

1) ต้มน้ำประมาณครึ่งหนึ่งให้เดือดจากนั้นใส่ใบชาลงไปแช่ประมาณ 6-10 นาที และนำใบชาออก
2) ทิ้งให้เย็น อุณหภูมิไม่เกิน 35 องศาเซลเซียส เพราะจะเป็นอันตรายต่อ scoby
3) ใส่ scoby และ starter (pH 2.5-3.5) ควรให้มีระยะห่างอย่างน้อย 5 เซนติเมตรจากด้านบนภาชนะเพื่อให้เกิดการหมัก และ scoby เจริญได้
4) ปิดปากภาชนะหมักด้วยผ้าหรือกระดาษชำระ จากนั้นใช้ยางรัดป้องกันฝุ่นและแมลง
5) หมักทิ้งไว้ 9-10 วันที่อุณหภูมิห้อง (26-27 องศาเซลเซียส) หลีกเลี่ยงรังสี และการโดนแสงแดดโดยตรง
6) หลังจากการหมักระยะนี้สามารถหมักขั้นที่ 2 ได้ โดยการแต่งกลิ่น หรือผลไม้ แล้วนำไปหมักในขวด ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1-3 วัน จากนั้นเก็บในตู้เย็น (Poffley, S., & Norris, A. 2019)

2.4. สารประกอบฟีนอล (Phenolic compound)

สารประกอบฟีนอลมีสูตรโครงสร้างเป็นวงแหวนที่เป็นอนุพันธ์ของวงแหวนเบนซินมีหมู่ไฮดรอกซิลอย่างน้อยหนึ่งหมู่ พบมากในพืชชที่ต้องการดึงดูดแมลงหรือสัตว์เพื่อช่วยในผสมเกสรหรือเพื่อกระจายเมล็ดพันธุ์ของพืช นอกจากนี้สารประกอบฟีนอลยังช่วยปกป้องพืชจากสารออกซิแดนท์และรังสีอัลตราไวโอเลตได้อีกด้วย ตัวอย่างของสารประกอบฟีนอลได้แก่ simple phenolics, benzoquinones, hydroxybenzoic acids, hydroxycinnamic acids, phenylpropanoids, acetophenones และ phenylacetic acids, xanthones, stilbenes, anthraquinones, flavonoids, isoflavonoids, lignans, neolignans, lignins และ condensed tannins (proanthocyanidins หรือ flavolans) อาหารที่เป็นแหล่งของสารประกอบฟีนอลได้แก่ผัก ผลไม้ ชา และธัญพืช (Vuolo, M.M. et al 2019)

การวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย ได้แก่ การวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดโดยวิธี Folin-Ciocalteu Method (Singletonetal.,1999) โดยสารประกอบฟีนอลจะถูกรีดิวซ์ด้วย Folin-Ciocalteureagent ซึ่งประกอบไปด้วย phosphomolybdate ($PMo_{12}O_{40}$) และ phosphortungstic ($H_3PW_{12}O_{40}$) สารละลายจะนำไปวัดค่า absorbance ด้วยเครื่อง spectrophoto meter ที่ความยาวคลื่น 765 nm นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณของสารประกอบฟีนอลทั้งหมด นำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ gallic acid แสดงผลเป็นค่า gallic acidequivalent (GAE) ซึ่ง Folin-Ciocalteu reagent สามารถทำปฏิกิริยากับ monohydroxyphenols และสารอื่น ๆ ที่ถูกออกซิไดซ์รวมถึง ascorbic acid, sulfer dioxide และ aromatic amines)

2.5. สารต้านอนุมูลอิสระ (Cornelli, U. 2009)

สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) คือสารที่สามารถป้องกันหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยา oxidation จาก (reactive oxygen species (ROS) ซึ่งเกิดขึ้นได้จากสิ่งแวดล้อมและกระบวนการต่าง ๆ ดังนั้น ร่างกายจึงต้องสร้างสารต้านอนุมูลอิสระขึ้นมาเพื่อกำจัดและลดความรุนแรงของ ROS ที่เกิดขึ้นด้วย เช่น co-enzyme Q10, alpha-lipoic acid เป็นต้น โดย ปกติแล้วการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายนั้นมีอย่างเพียงพอต่อการเกิดอนุมูลอิสระขึ้น ภายในร่างกาย แต่หากมีสภาวะผิดปกติในร่างกาย เช่นความเครียดการนอนดึกติดต่อกันนาน ๆ การรับประทานยาที่มีผลลด antioxidant enzyme หรือสภาวะโรคต่าง ๆ ก็อาจจะทำให้การสร้างอนุมูลอิสระ เพิ่มขึ้นจนเสียสมดุลระหว่าง antioxidant และ อนุมูลอิสระเกิดเป็นภาวะ oxidative stress อนุมูลอิสระที่ไม่ได้ถูกกำจัดจะไปทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อ ทำให้เป็นต้นเหตุของการเกิดโรคต่าง ๆได้ เช่น เป็นต้นเหตุของภาวะหลอดเลือดอุดตัน มะเร็ง Parkinson รวมถึงอาการอักเสบต่าง ๆ จะเห็นได้ว่า สารต้านอนุมูลอิสระใน ร่างกายนั้นมีความสำคัญในการป้องกันการเกิดโรคและความเสื่อมของร่างกายเป็นอย่างมากนอกจากการไปจับกับอนุมูลอิสระแล้ว สารต้านอนุมูลอิสระควรจะต้องมีคุณสมบัติ ดังต่อไปนี้ร่วมด้วย

- ป้องกันการเกิดของ ROS ได้
- สามารถจับกับ ROS ที่เกิดขึ้นก่อนที่ ROS นั้นจะไปทำอันตรายเนื้อเยื่อต่าง ๆ
- ต้องไม่เพิ่มความแรงของอนุมูลอิสระหรือไม่เปลี่ยน ROS ไปเป็น ROS ที่มีความแรงสูงเช่นไม่เปลี่ยนจาก superoxideไปเป็น hydroxyl radical เป็นต้น
- ทำให้เกิดสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของ antioxidant enzyme หรือสารต้านอนุมูล อิสระ
- เพิ่มการแสดงออกของยีนที่ใช้สร้าง antioxidant enzyme และช่วยในการฟื้นฟูความเสียหาย ของเซลล์หรือเนื้อเยื่อจากการถูกทำลายด้วยอนุมูลอิสระ (ดร.อธิป สกุลเผือก)

2.5.1 ประเภทของสารต้านอนุมูลอิสระ

Primary antioxidant เป็น phenolic compound ทำหน้าที่หยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ในปฏิกิริยาของการออกซิเดชั่นของไขมันทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอน

1) Oxygen scavenger ได้แก่ วิตามินซี เข้าทำปฏิกิริยากับออกซิเจน ช่วยลดออกซิเจนได้
2) Secondary antioxidant ได้แก่ thiopro-pionicacid ซึ่งช่วยสลาย lipid hydroperoxide
3) Superoxide dismutase (SODs) และ catalase (CAT) ช่วยกำจัดออกซิเจนและอนุพันธ์ออกซิเจน เช่น H_2O_2
4) Metal chelating ได้แก่ กรดซิตริก, กรดอะมิโน, ทำหน้าที่จับกับไอออนของโลหะ กลไกการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระมีหลายรูปแบบเช่น free radical scavenging, metal chelation, singlet oxygen quenching แต่สำหรับฟลาโวนอยด์จะใช้กลไกการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (enzyme inhibition) โดยยับยั้งการทำงานของ lipoxygenase ซึ่งไปจับกับเหล็กที่เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ (ไพนุพงศ์, 2560)

2.6. การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

DPPH assay เป็นวิธีการวิเคราะห์**ฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ** (antioxidant) โดยใช้ reagent คือ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl เป็นวิธีที่สะดวกรวดเร็วและง่ายต่อการวิเคราะห์ มีความถูกต้องและแม่นยำสูง โดย DPPH ทำหน้าที่เป็น stable radical ในตัวทำละลายเมทานอล (methanol) สารละลายนี้มีสีม่วงซึ่งดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 515-517 นาโนเมตร (nm) โดยDPPH● จะเกิดปฏิกิริยากับ antioxidant (AH) หรือกับ radical species (R●) ดังสมการที่ 2.1 และ 2.2และ 2.2

DPPH● + AH---------- DPPH-H + A● (2.1)

DPPH● + R●---------- DPPH-R (2.2)

การศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชัน ในสารตัวอย่างนิยมรายงานเป็นค่า 50% effective concentration (EC50) ซึ่งหมายถึงปริมาณสารต้านออกซิเดชันที่ทำให้ความเข้มข้นของ DPPH● ลดลง 50% โดยสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารตัวอย่างกับค่าการดูดกลืนแสงแล้วหาค่า EC50 จากกราฟแสดงค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่สามารถทำให้ความเข้มข้นของ DPPH ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ แล้วใช้ค่า EC50 ในการเปรียบเทียบความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระหว่างตัวอย่างที่ทดสอบกับกราฟมาตรฐานของกรดแอสคอร์บิก คำนวณ % Radical Scavenging (เปอร์เซ็นต์การออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ) (เด่นรุ่งเรือง, 2550) ดังสมการที่ 2.3

%Radical Scavenging = [(AB - AA) / AB] x 100 (2.3)

เมื่อ AA = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารตัวอย่างผสมกับ DPPH

2.7. ปัจจัยที่จำเป็นต่อการเจริญของยีสต์

- แหล่งคาร์บอน

ยีสต์ส่วนมากจะใช้ fermentable sugar เช่น D-glucose, D-fructose และ D-mannose ได้ดี บางชนิดสามารถใช้แป้งได้ เช่น *Endomycopsis fibuligera* บางชนิดใช้ insulin เช่น *Frabospora fragilis* และบางชนิดใช้ pentose ได้ เช่น *Candida utillis* นอกจากนี้บางชนิดยังใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้

- แหล่งไนโตรเจน

ยีสต์ต้องการแหล่งไนโตรเจนเพื่อใช้ในการสร้างโปรตีน แหล่งไนโตรเจนที่ยีสต์นำมาใช้ได้มีหลายแหล่ง ยีสต์ทุกชนิดใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ ส่วนแอมโมเนียมฟอสเฟต โมโนและไดแอมโมเนียมฟอสเฟต แอมโมเนียมไบคาร์บอเนต แอมโมเนียมคาร์บอเนต แอมโมเนียมทาร์เตรทและยูเรียนั้น ยีสต์หลายชนิดสามารถใช้ได้ดี ในการผลิตยีสต์เพื่อเป็นอาหารเสริมโปรตีนส่วนมากนิยมใช้สารละลายแอมโมเนียซัลเฟตหรือยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน

- แหล่งฟอสฟอรัส

ยีสต์ต้องการแหล่งฟอสฟอรัสเพื่อใช้ในการสร้างพลังงาน เซลล์ยีสต์มีความสามารถดูดซึม สารโพแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตได้ดีกว่าไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต สารอาหารอื่นๆ นั้น ยีสต์ต้องการในปริมาณต่ำ ได้แก่ แร่ธาตุต่าง ๆ เพื่อเป็นโคแฟคเตอร์ของเอนไซม์ต่าง ๆ เช่น แมกนีเซียม โคบอลท์ โมลิบดีนัม ทองแดง และสังกะสี เป็นต้น นอกจากนั้น ยีสต์ยังต้องการ growth factor บางชนิดเช่น ไบโอติน แพนโททีนิคแอซิดอิโนซิโทล ไทอามีน นิโคลินิคแอซิด ไมริดอกซิน และโฟลิคแอซิด

- ความเป็นกรดด่างของอาหาร

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีความเป็นกรดมากกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ปกติ pH ที่เหมาะสมของยีสต์ทั่วไปอยู่ระหว่าง 4.5-5.5 pH ที่เหมาะสมแต่ละชนิดจะแตกต่างกัน เช่น *Candida utilis* ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ที่เหมาะสมคือ 4.5-5.5 และ *Endomycopsis Fibuligera* pH ที่เหมาะสมคือ 6.0 เป็นต้นอุณหภูมิยีสต์ส่วนใหญ่เจริญได้ดีระหว่าง 20–30 °C แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมของยีสต์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันเช่น *Endomycopsis fibuligera* กับ *Saccharomyces cerevisiae* อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตจะอยู่ 35 °C

บทที่ 3
วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1. วัตถุดิบ

- ใบอ่อนป่าจากไร่อ่อนของบริษัท สยามไวเนอรี่ จำกัด ตำบลบางโทรัด อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรสาคร
- SCOBY ยี่ห้อ HUGNER

3.2. สารเคมี

3.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการหมัก

- diammonium phosphate; DAP ($(NH_4)_2HPO_4$)
- sucrose ($C_{12}H_{22}O_{11}$)

3.2.2 ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดชาหมัก

- acetone (C_3H_6O)

3.2.3 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ Total acid (TA)

- sodium hydroxide (NaOH)
- phenopthalein ($C_{20}H_{14}O_4$)

3.2.4 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ Volatile acid (VA)

- hydrogen peroxide (H_2O_2)
- sodium hydroxide (NaOH)
- phenopthalein ($C_{20}H_{14}O_4$)

3.2.5 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ residual sugar

- glucose ($C_6H_{12}O_6$)
- 3,5-dinitrosalicylic acid ($C_7H_4N_2O_7$)

3.2.6 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ DPPH radical scavenging activity

1) methanol (CH_3OH)

2) 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl ; DPPH ($C_{18}H_{12}N_5O_6$)

3) ascorbic acid ($C_{14}H_8O_6$)

3.2.7 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ Folin-ciocalteu colorimetric method

1) Folin-Ciocalteu reagent

2) sodium carbonate (Na_2CO_3)

3) gallic acid ($C_7H_6O_5$)

3.3. เครื่องมือ

3.3.1. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมใบอุ่น

1) Hot air oven
2) เครื่องปั่นบดผง

3.3.2. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ทางเคมี

1) Rotary vacuum evaporator (EyelaN-NseriesSB-651,Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Japan)
2) Spectrophotometer (Hitachi, U-5100)
3) เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo, MS204S/01, Switzerland)
4) เครื่องวัด pH (Eutech Instruments, pH 2700 meter, Ayer Rajah Crescent, Singapore)
5) Alcohol meter (Anton Parr)
6) ชุดกลั่นไอน้ำ
7) Hot plate
8) GC-MS

3.4. ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.4.1 การเตรียมตัวอย่างชาใบอุ่น (ศราวุธ แวดไธสง, 2562)

1) นำใบอุ่นป่า 1-3 ใบแรกนับจากยอด (ใบอ่อน) มาล้าง และผึ่งให้แห้ง
2) นำใบมาคั่วเป็นเวลา 1.00-1.30 นาที โดยใช้ Hot plate แล้วนำมานวด จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนได้ moisture content เท่ากับ 5% แล้วจึงนำมาปั่นโดยใช้เครื่องปั่นแห้ง นำชาผงที่ได้ใส่ถุงชาถุงละ 4 กรัม

3.4.2 การหมักชาหมัก

1) แช่ชาใบอุ่นที่เตรียมไว้ 24 กรัม ในน้ำอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ปริมาตร 1500 มิลลิลิตร เป็นเวลา 20 นาที ใส่น้ำเพิ่มอีก 1500 มิลลิลิตร เติม sucrose 300 กรัม ตั้งทิ้งไว้จนมีอุณหภูมิเท่าอุณหภูมิห้อง ทำจำนวน. 6 โหล
2) แช่ชาดำ 24 กรัม ในน้ำอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ปริมาตร 1500 มิลลิลิตร เป็นเวลา 20 นาที ใส่น้ำเพิ่มอีก 1500 มิลลิลิตร เติม sucrose 300 กรัม ตั้งทิ้งไว้จนมีอุณหภูมิเท่าอุณหภูมิห้อง ทำจำนวน. 1 โหล
3) นำ SCOBY และน้ำ starter ที่มีการชั่งน้ำหนักเรียบร้อยแล้วลงในโหลทั้ง 7 โหล
4) เติม DAP 0.1 %w/v ลงในโหลของชาใบอุ่นทั้ง 3 โหล

5) ปิดปากโหลด้วยผ้าขาวบางและมัดด้วยเชือก หมักเป็นเวลา 21 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

3.4.3 การสกัดชาใบอ่อนและเครื่องดื่มชาหมักเพื่อวิเคราะห์สารประกอบฟีนอล (ดัดแปลงจาก Amarowicz, R. et al., 2008)

สกัดสารประกอบฟีนอลโดยใช้ acetone 80% (v/v) สกัดชาใบอ่อนด้วยอัตราส่วน 1:1 v/v ผสมให้เข้ากันโดยใช้ magnetic stirrer เป็นเวลา 30 นาที และนำไประเหยตัวทำละลายโดยใช้ rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 90 นาที เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.4.4 การวิเคราะห์ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ (Titratable acidity หรือ TA)

ปิเปตตัวอย่างปริมาตร 10 ml ลงใน flask เติมน้ำกลั่น 50 ml จากนั้นเติม Phenolpthalein indicator 2-3 หยด นำไปไทเทรตกับ 0.1 N NaOH ที่บรรจุในบิวเรตต์จนถึงจุดยุติ สารละลายเปลี่ยนจากสีเหลืองอ่อนเป็นส้มอ่อน จดปริมาตร NaOH ที่ใช้ และนำไปคำนวณหาปริมาณกรด

$$\text{T.A. (g/l)} = \frac{\text{Normal ของ NaOH x ปริมาตรของ NaOH ที่ใช้(ml)xกรัมสมมูลของกรด}}{\text{ปริมาตรของตัวอย่างชาที่ใช้ (ml)}}$$

3.4.5 การวิเคราะห์ปริมาณกรดอะซิติก

1. กลั่นน้ำให้ได้ปริมาตร 50 ml โดยการกลั่นแบบไอน้ำ (steam distillation) เติมphenolpthalein 2-3 หยด บันทึกปริมาตร Blank
2. นำตัวอย่างมา 10 ml ใส่ลงในชุดกลั่น เติม 0.3%H2O2 10 ml
3. เก็บของเหลวที่กลั่นได้ 150 ml นำมาไตเตรทกับ 0.1 N NaOH solution บันทึกปริมาตรที่ใช้
4. คำนวณหาปริมาณกรดที่ระเหยได้ เทียบกับปริมาณกรดที่ระเหยได้ที่มีอยู่มากในอาหารนั้น ๆ (ชนิดของกรดที่ระเหยได้ในไวน์คือ กรดอะซิติก)

วิธีการคำนวณ

$$\text{กรดอะซิติก, g/100 ml} = \frac{(V1-V_{blank})(N)(60)(100)}{(1000)(v)}$$

V1 = ปริมาตรของ NaOH ที่ใช้ในการไตเตรทตัวอย่าง (ml)

V_{blank} = ปริมาตรของ NaOH ที่ใช้ในการไตเตรท Blank (ml)

N = Normality ของ NaOH solution

60 = กรัมสมมูลย์ของกรดอะซิติก

V = ปริมาตรของตัวอย่างไวน์ (ml)

3.4.6 การวัดร้อยละของปริมาณแอลกอฮอล์

วัดร้อยละของแอลกอฮอล์โดยใช้เครื่อง Alcohol meter

3.4.7 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่ (Reducing sugar หรือ RS) (ดัดแปลงจาก Miller, 1959)

1) เตรียมกราฟมาตรฐานโดยใช้กลูโคสเป็นสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.9, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 g/L

2) นำตัวอย่างปริมาตร 200 µl ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลาย 3,5-Dinitrosalicylic acid ปริมาตร 200 µl ผสมให้เข้ากัน ต้มน้ำเดือด 5 นาที แล้วเติมน้ำกลั่นหลอดละ 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสารละลายมาตรฐาน

3.4.8 การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (ดัดแปลงจาก Nworie, K.M. & Okorie, N.A., 2018)

เติม DPPH (ในเมทานอล) ความเข้มข้น 0.2 mM จำนวน 1.0 ml ลงในสารสกัดตัวอย่าง 1.0 ml ผสมให้เข้ากันและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm โดยใช้ ascorbic acid เป็นสารละลายมาตรฐาน

$$\text{Inhibition (\%)} = 100 \times (A_{control} \times A_{sample})/A_{control}$$

3.4.9 การวิเคราห์สารประกอบฟีนอลทั้งหมดตามวิธีของ Folin-Ciocalteu colorimetric assay (Borai, I.H. et al., 2017)

นำตัวอย่างสารสกัด 500 µl ผสมกับ Folin-Cicalteu reagent 250 µl ทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นเติม 20% Na2CO3 ปริมาตร 1.25 ml ทิ้งไว้ 40 นาที ในที่มืด วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 725 nm โดยใช้ Gallic acid เป็นสารละลายมาตรฐาน รายงานเป็นมิลลิกรัมสมมูลของ Gallic acid (GAE)

3.4.10 การทดสอบทางประสาทสัมผัส

ประเมินความชอบด้าน ลักษณะปรากฏ กลิ่น รส และความชอบโดยรวมโดยผู้ทดสอบที่มีความเชี่ยวชาญ (7 คน) โดยผู้ทดสอบให้คะแนนความชอบบนสเกล 9-point-hedonic scale การทดสอบทางประสาทสัมผัสแบบ Quantitative Descriptive Analysis (QDA) โดยใช้ผู้ทดสอบมีความเชี่ยวชาญ (7 คน) ทดสอบกลิ่น acetic acid, ferment, sweet, tea รวมถึงรสเปรี้ยวและหวาน

3.4.11 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลเชิงสถิติจากการทดลองโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) โดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel และวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยของกลุ่มตัวอย่าง โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS statistic

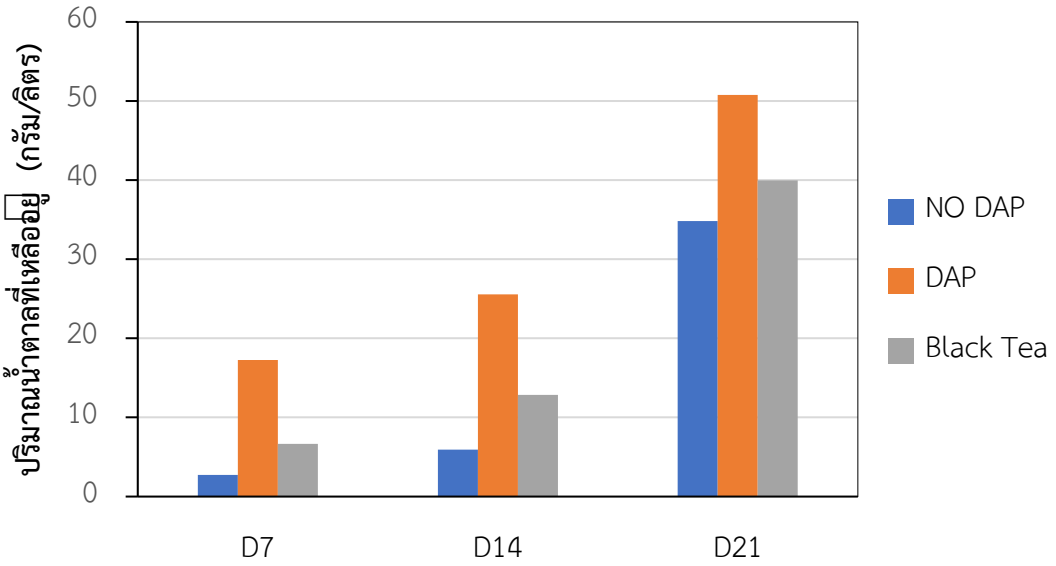
บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

งานวิจัยนี้ต้องการศึกษาการเปลี่ยนแปลงระหว่างกระบวนการหมัก ตัวอย่างชาหมักจากใบอ่อนที่ไม่เติมและเติม Diammonium phosphate (No DAP, DAP) และชาหมักจากชาดำ (Black Tea) ตลอดระยะเวลาการหมัก 21 วัน การเติม DAP มีวัตถุประสงค์เพื่อเติมแหล่งไนโตรเจนซึ่งเป็นแหล่งอาหารให้จุลินทรีย์เนื่องจากใบอ่อนมีปริมาณไนโตรเจนในปริมาณน้อย ปริมาณไนโตรเจนที่เติมลงไปจากสารละลาย DAP คิดเป็น 0.21 กรัม ต่อลิตร ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับไนโตรเจนที่พบในชาดำที่ใช้ในการหมัก โดยในระหว่างกระบวนการหมักจะมีการตรวจวิเคราะห์ค่าความเป็นกรดด่าง (pH), ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ (titratable acidity), ปริมาณกรดอะซิติก (acetic acid acid), ปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่ (residual sugar), ปริมาณแอลกอฮอล์, ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ, ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างและประเมินการยอมรับโดยผู้ทดสอบที่มีความเชี่ยวชาญเทียบกับตัวอย่างเครื่องดื่ม Kombucha จากท้องตลาด 2 ตัวอย่าง ได้แก่ ยี่ห้อ A และ B โด

ยทำการทดสอบด้วย 9-point-hedonic scale ซึ่งใช้ผู้ทดสอบทั้งหมด 7 คน และทดสอบคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสด้วยวิธี Quantitative Descriptive Analysis (QDA) โดยใช้ผู้ทดสอบมีความเชี่ยวชาญทั้งหมด 5 คน

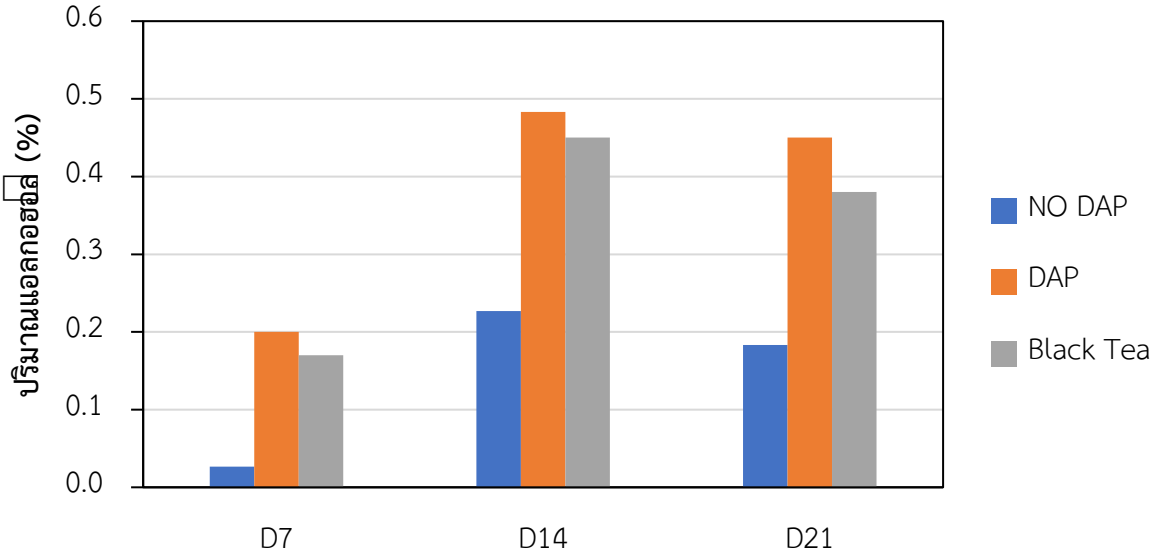
4.1 ปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่ (Residual sugar, RS)



ภาพที่ 4.1 ปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่ของเครื่องดื่มชาหมักจากใบอ่อนที่ไม่เติม DAP (no DAP) และเติม DAP (DAP) และชาหมักจากชาดำ (Black tea) ตลอดกระบวนการหมัก 21 วัน

จากการหมักชาหมัก 3 ตัวอย่าง ได้แก่ ชาหมักจากใบอ่อนไม่เติมและเติม DAP และชาหมักจากชาดำ พบว่าปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่ ซึ่งประกอบไปด้วยน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุกโตส จากภาพที่ 4.1 ชาหมักทั้ง 3 ตัวอย่างมีปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่เพิ่มขึ้นตลอดระยะกระบวนการหมัก 21 วัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Skocinska และคณะ (2017) ที่รายงานว่า ปริมาณน้ำตาลซูโครสในเครื่องดื่มชาหมักมีค่าลดลง ในขณะที่น้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตสมีปริมาณเพิ่มขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก เป็นผลมาจากเอนไซม์ invertase ของยีสต์สามารถย่อยน้ำตาลซูโครสเป็นน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตสได้ จากงานวิจัยยังพบว่า (ภาพที่ 4.1) ชาหมักจากใบอ่อนที่เติม DAP จะมีค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่สูงกว่าชาหมักจากใบอ่อนที่ไม่เติม DAP และชาหมักจากชาดำอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเติม DAP เป็นแหล่งไนโตรเจนที่สำคัญให้แก่จุลินทรีย์ในชาหมักสามารถนำน้ำตาลไปใช้ได้มากกว่าเครื่องดื่มชาหมักที่ไม่เติม DAP และมีประมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่ใกล้เคียงกับชาหมักจากชาดำที่มีแหล่งไนโตรเจนโดยธรรมชาติอยู่แล้ว Villarreal และคณะ (2018) ได้อธิบายว่าแบคทีเรียจะเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็น gluconic acid และ glucuronic acid ในขณะที่น้ำตาลฟรุกโตส จะถูกนำไปใช้ในการผลิตเอทานอล และยังมีแบคทีเรียในกลุ่ม acetobacter ได้แก่ *Komagataeibacter xylinum* ที่สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตสในการสร้าง cellulose ของ scoby ได้ และมีการสะสมน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวทำให้ปริมาณน้ำตาลสูงขึ้น

4.2 ปริมาณแอลกอฮอล์



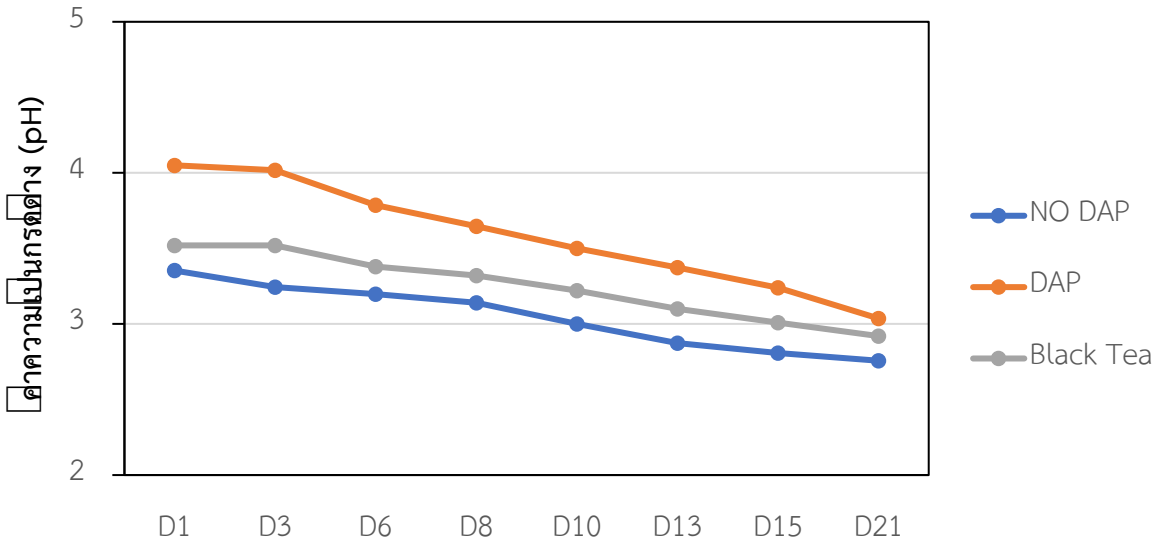
ภาพที่ 4.2 ปริมาณแอลกอฮอล์ของเครื่องดื่มชาหมักจากใบอ่อนที่ไม่เติม DAP (no DAP) และเติม DAP (DAP) และชาหมักจากชาดำ (Black tea) ตลอดกระบวนการหมัก 21 วัน

จากภาพที่ 4.2 ในวันที่ 14 ตัวอย่างชาหมักจากใบอ่อนที่ไม่เติม DAP (no DAP) และเติม DAP (DAP) และชาหมักจากชาดำ (Black tea) มีปริมาณแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เนื่องจากการผลิต

ของยีสต์ แต่มีปริมาณแอลกอฮอล์ลดลงภายหลังการหมักเป็นระยะเวลา 21 วัน เนื่องจาก acetic acid bacteria ใช้แอลกอฮอล์เพื่อผลิตกรดอินทรีย์ นอกจากนี้ยังพบว่าตัวอย่างชาหมักจากใบอ่อน ที่เติม DAP และชาหมักจากชาดำมีปริมาณแอลกอฮอล์สูงกว่าชาหมักที่ไม่เติม DAP อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ซึ่งอาจเป็นผลจากยีสต์และแบคทีเรียมีปริมาณไนโตรเจนที่มากกว่าชาหมักที่ไม่เติม DAP Tran และคณะ (2020) ได้รายงานว่าปริมาณแอลกอฮอล์ในเครื่องดื่มชาหมักขึ้นอยู่กับกระบวนการเมตาโบลิซึมของยีสต์และแบคทีเรียใน Scoby ด้วย Jin และคณะ (2015) รายงานว่าไวน์ที่เติม DAP จะมีปริมาณแอลกอฮอล์มากกว่าไวน์ที่ไม่เติม DAP อย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากไนโตรเจนเป็นสารอาหารสำคัญในกระบวนการเมตาโบลิซึมและการเจริญเติบโตของยีสต์

4.3 ค่าความเป็นกรดด่าง (pH)

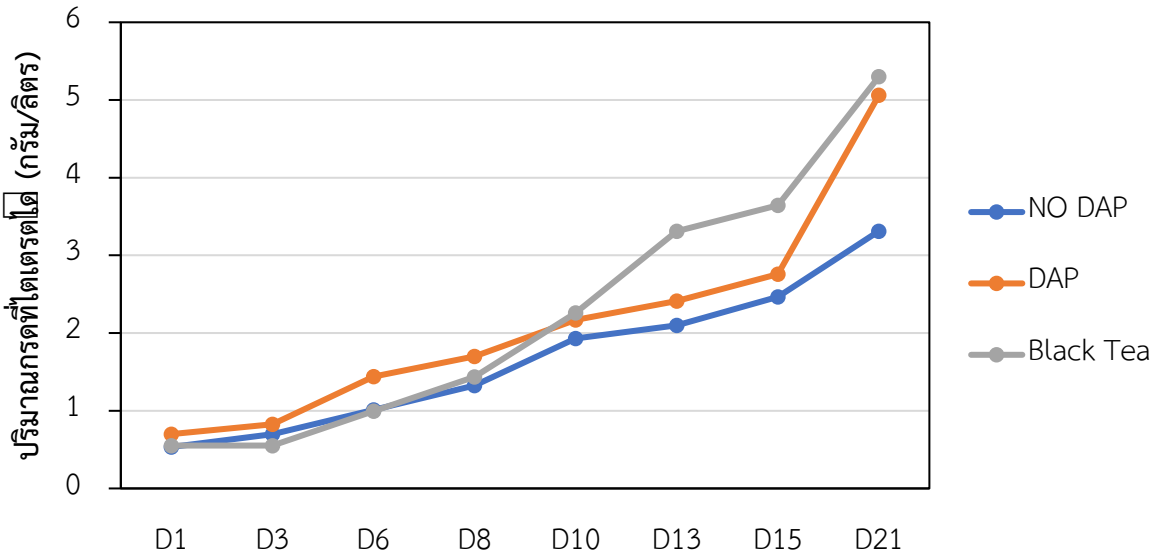
ในระหว่างการหมักชาหมักทั้ง 3 ตัวอย่าง พบว่าค่าความเป็นกรดด่างลดลงตลอดระยะเวลาการหมัก 21 วัน เนื่องจากมีการผลิตกรดอินทรีย์ที่มากขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 4.3 โดยตัวอย่างชาหมักจากใบอ่อนที่เติม DAP มีค่าความเป็นกรดด่างต่างจากชาหมักที่ไม่เติม DAP และชาหมักจากชาดำอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เนื่องจาก DAP มีค่าความเป็นกรดด่าง 7-8 จึงทำให้ค่า pH เริ่มต้นของชาหมักจากใบอ่อนที่เติม DAP สูงกว่าชาหมักที่ไม่เติม DAP แต่อย่างไรก็ตามค่าความเป็นกรดด่างภายหลังการหมัก 21 วันชาหมักจากใบอ่อนที่เติม DAP มีค่าความเป็นกรดด่างใกล้เคียงกับชาหมักจากชาดำ เนื่องจากชาหมักจากใบอ่อนที่เติม DAP ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนอาจช่วยให้แหล่งไนโตรเจนของยีสต์และแบคทีเรียทำงานจุลินทรีย์สามารถผลิตกรดอินทรีย์ได้ดี จนทำให้ชาหมักจากชาใบอ่อนที่เติม DAP มีค่าความเป็นกรดด่างใกล้เคียงกับชาหมักจากชาดำซึ่งใช้แหล่งไนโตรเจนธรรมชาติจากใบชาดำได้



ภาพที่ 4.3 ค่าความเป็นกรดด่างของเครื่องดื่มชาหมักจากใบอ่อนที่ไม่เติม DAP (no DAP) และเติม DAP (DAP) และชาหมักจากชาดำ (Black tea) ตลอดกระบวนการหมัก 21 วัน

4.4 ปริมาณกรดที่ไตเตรตได้ (titratable acidity)

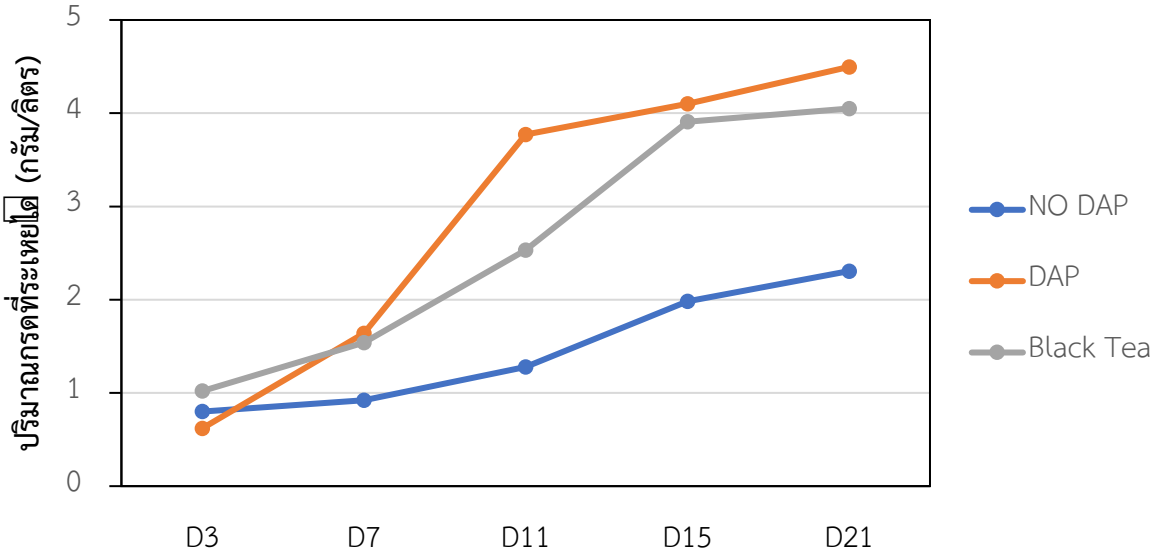
ดังแสดงในภาพที่ 4.4 ชาหมักจากชาดำมีปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ทั้งหมดมากกว่าตัวอย่างอื่นในวันที่ 10 ของการหมัก แต่ปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ของชาหมักจากใบอ่อนที่เติม DAP ไม่ต่างจากชาหมักจากชาดำเมื่อหมักเป็นระยะเวลา 21 วัน นอกจากนี้ยังพบว่าชาหมักจากใบอ่อนที่ไม่เติม DAP มีปริมาณกรดที่ไตรเตรทได้ต่ำที่สุดตลอดระยะเวลาการหมักVilanova และคณะได้รายงานว่า เมื่อเพิ่มปริมาณไนโตรเจนสำหรับยีสต์เพื่อใช้ในการหมักไวน์ พบว่าตัวอย่างที่มีปริมาณไนโตรเจนเริ่มต้นสูงจะมีการผลิต acetic acid มากขึ้น อย่างไรก็ตามปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของยีสต์ที่ใช้ในการหมักด้วย Tran และคณะ (2020) พบว่า acetic acid bacteria จะสามารถย่อยน้ำตาลซูโครสได้ในสภาวะที่เป็นกรด ควบคู่ไปกับการย่อยน้ำตาลซูโครสของยีสต์ ด้วยเหตุนี้จึงอาจทำให้สามารถผลิตกรดได้มากแม้จะมีเมตตาโบลิซึมของยีสต์น้อยก็ตาม



ภาพที่ 4.4 ปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ของเครื่องดื่มชาหมักจากใบอ่อนที่ไม่เติม DAP (no DAP) และเติม DAP (DAP) และชาหมักจากชาดำ (Black tea) ตลอดกระบวนการหมัก 21 วัน

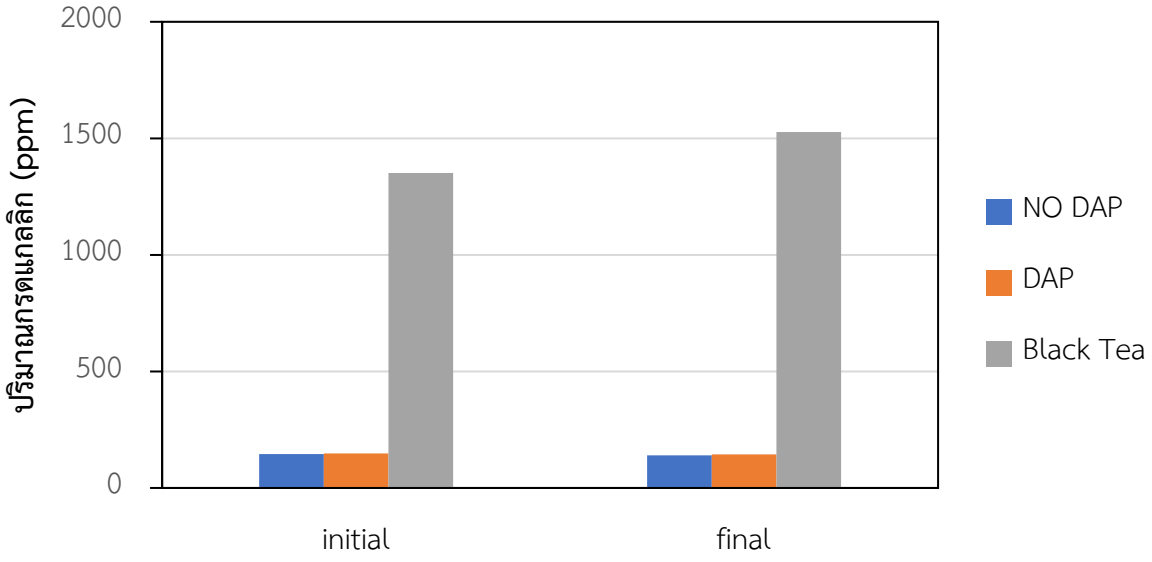
4.5 ปริมาณกรดที่ระเหยได้ (volatile acid)

acetic acid เป็นกรดที่พบมากที่สุดของเครื่องดื่มชาหมัก ตลอดระยะเวลาการหมักปริมาณของ acetic acid เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในทุกตัวอย่าง ($p \leq 0.05$) ตลอดระยะเวลาการหมัก ดังแสดงในภาพที่ 4.5 โดยใน 7 วันแรกของกระบวนการหมัก เครื่องดื่มชาหมักจากชาดำมีปริมาณ acetic acid มากที่สุด แต่หลังจากนั้นตัวอย่างชาหมักจากใบอ่อนที่เติม DAP มีปริมาณ acetic acid เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อสิ้นสุดการหมัก 21 วัน ชาหมักจากชาดำและชาหมักจากใบอ่อนที่เติม DAP มีปริมาณ acetic acid ใกล้เคียงกัน Joshi และคณะ (2011) รายงานว่าการเติม DAP ซึ่งเป็นแหล่งของไนโตรเจน มีความจำเป็นต่อการเจริญของยีสต์และยังช่วยเร่งกระบวนการหมักยีสต์ ทำให้ผลิตแอลกอฮอล์ได้มาก ซึ่งเกิดเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ acetic acid bacteria ซึ่งจะเปลี่ยนแอลกอฮอล์เป็นกรดอินทรีย์



ภาพที่ 4.5 ปริมาณacetic acid ของเครื่องดื่มชาหมักจากใบอ่อนที่ไม่เติม DAP (no DAP) และเติม DAP (DAP) และชาหมักจากชาดำ (Black tea) ตลอดกระบวนการหมัก 21 วัน

4.6 สารประกอบฟีนอลทั้งหมด



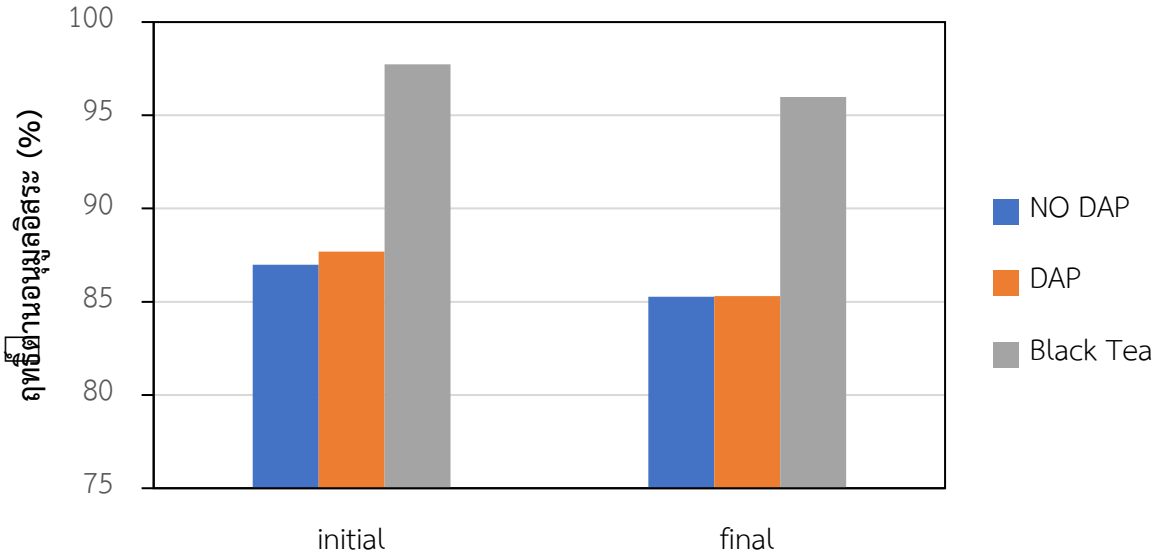
ภาพที่ 4.6 ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดของเครื่องดื่มชาหมักจากใบอ่อนที่ไม่เติม DAP (no DAP) และเติม DAP (DAP) และชาหมักจากชาดำ (Black tea) ตลอดกระบวนการหมัก 21 วัน

จากผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 4.6 พบว่าชาหมักจากชาดำจะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดมากกว่าตัวอย่างอื่น โดยสารประกอบฟีนอลทั้งหมดของเครื่องดื่มชาหมักทั้งสามตัวอย่างก่อนและหลัง

กระบวนการหมัก ไม่มีความแตกต่างในทุกตัวอย่าง Jakubczyk และคณะ (2020) รายงานว่าการเพิ่มขึ้นของสารประกอบฟีนอล เกิดจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการหมักเช่น ออกซิเดชั่นของสารประกอบฟีนอลโดยเอนไซม์ทำให้เกิด catechins, flavonoid แต่อาจเกิดจากการ degradation ของโมเลกุล polyphenol และ flavonoids กลายเป็นโมเลกุลที่เล็กลง ด้วยเอนไซม์ของจุลินทรีย์ได้ เช่น phytase, α-galactosidase และ tannase เป็นต้น

4.7 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

จากผลการทดลองพบว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในก่อนและหลังกระบวนการหมักเครื่องดื่มชาหมักจากใบอ่อนไม่เติม DAP และเติม DAP และชาหมักจากชาดำไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 4.7 และยังพบว่าชาหมักจากชาดำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าตัวอย่างอื่นตั้งแต่เริ่มต้น เป็นที่ทราบกันว่าชาดำเป็นชาที่มีสารประกอบฟีนอลสูงกว่าชาอื่นๆ ส่งผลให้มีฤทธิ์การต้านออกซิชั้นสูงด้วย ธรรณพ เหล่ากุลดิลก (2564) ได้อธิบายว่ากระบวนการหมักหากใช้เวลาไม่นานพอ และอุณหภูมิในการหมักไม่สูงมากอาจส่งผลให้ฤทธิ์การต้านออกซิเดชั่นไม่มีความแตกต่างกันทั้งก่อนและหลังกระบวนการหมักได้



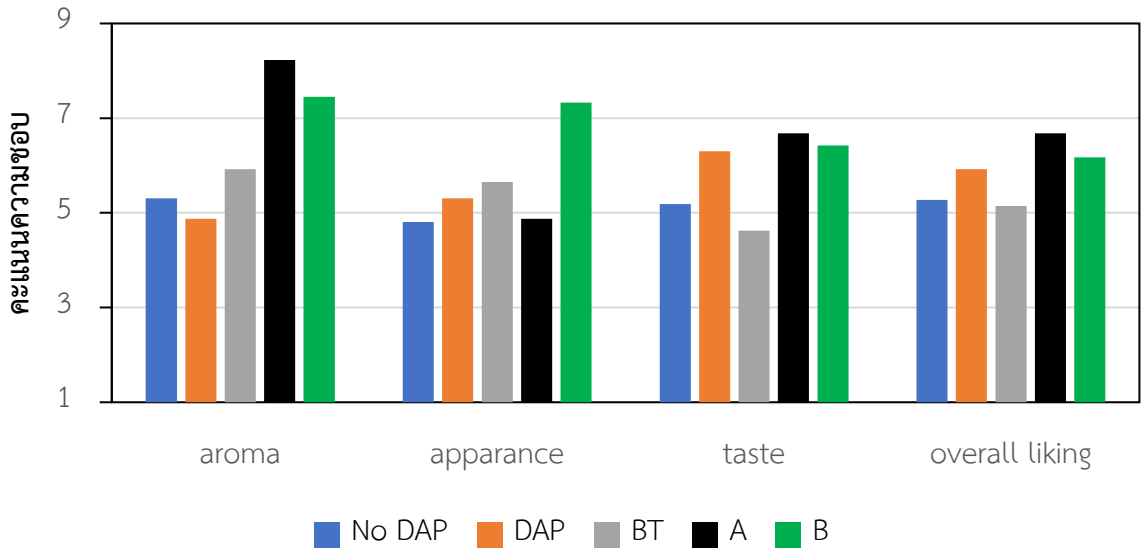
ภาพที่ 4.7 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเครื่องดื่มชาหมักจากใบอ่อนที่ไม่เติม DAP (no DAP) และเติม DAP (DAP) และชาหมักจากชาดำ (Black tea) ตลอดกระบวนการหมัก 21 วัน

4.8 การทดสอบทางประสาทสัมผัส

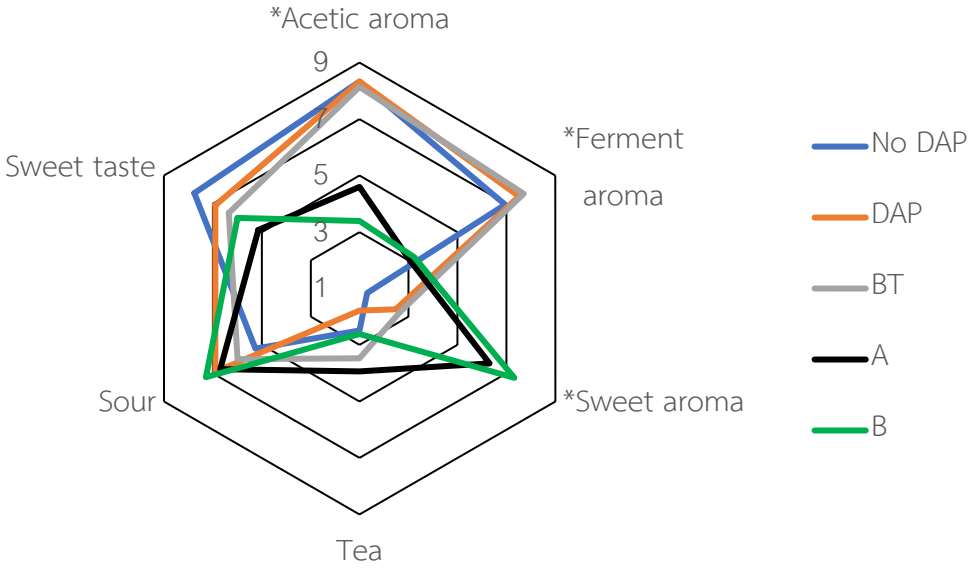
จากการศึกษาการยอมรับเครื่องดื่มชาหมักทั้งหมด 5 ตัวอย่าง ได้แก่ เครื่องดื่มชาหมักจากใบอ่อนที่ไม่เติม DAP และเติม DAP เครื่องดื่มชาหมักจากชาดำ, เครื่องดื่มชาหมักจากท้องตลาดยี่ห้อ A และ B โดยทำการทดสอบการยอมรับจากผู้ทดสอบที่มีความเชี่ยวชาญจากฝ่ายวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ ของบริษัท สยาม

ไวน์เนอรี่ ทั้งหมด 7 คน โดยใช้ 9 point-hedonic scale ซึ่งเครื่องดื่มชาหมักทั้ง 5 ตัวอย่าง ได้รับการยอมรับจากผู้เชี่ยวชาญ โดยได้รับคะแนนความชอบโดยรวมมากกว่า 5 เครื่องดื่มชาหมักจากท้องตลาดยี่ห้อ A และ B ได้รับการยอมรับมากที่สุด ทั้งในด้านความชอบโดยรวม ความชอบด้านกลิ่น และด้านรสชาติ อาจเนื่องมาจากผลิตภัณฑ์ดังกล่าวมีการแต่งกลิ่นและรสชาติแล้ว

ชาหมักจากชาดำแม้ได้รับคะแนนความชอบโดยรวมมากกว่า 5 แต่กลับไม่ได้รับการยอมรับด้านรสชาติ ซึ่งจากการสัมภาษณ์ผู้ทดสอบเพิ่มเติมพบว่ามีรสชาติเปรี้ยวแหลมบาดคอ ส่วนชาหมักจากใบอ่อนที่เติม DAP ไม่ได้รับการยอมรับในด้านกลิ่น เนื่องจากมีกลิ่นหมักที่ฉุน ส่วนชาหมักที่ไม่เติม DAP และชาหมักจากท้องตลาดยี่ห้อ A ไม่ได้รับ การยอมรับด้านลักษณะปรากฏ เนื่องจากมีความขุ่นและมีตะกอน



ภาพที่ 4.8 ผลการทดสอบการยอมรับของเครื่องดื่มชาหมักที่ไม่เติม DAP (no DAP) และเติม DAP (DAP), ชาหมักจากชาดำ (Black tea) และชาหมักจากท้องตลาดยี่ห้อ A และ B



ภาพที่ 4.9 คุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของเครื่องดื่มชาหมักที่ไม่เติม DAP (no DAP) และเติม DAP (DAP), ชาหมักจากชาดำ (Black tea) และชาหมักจากท้องตลาดยี่ห้อ A และ B

เมื่อทำการประเมินทางประสาทสัมผัสเชิงพรรณนา พบว่าตัวอย่างชาหมักจากใบอ่อนและชาหมักจากชาดำ มีกลิ่นของกรดอะซิติกและกลิ่นหมักเข้มข้นมากกว่าผลิตภัณฑ์ ชาหมักจากท้องตลาด โดยชาหมักจากท้องตลาดมีกลิ่นหอมหวานเด่นชัด ซึ่งอาจเนื่องมาจากได้มีการปรุงแต่งกลิ่นรสมาแล้ว และจากผลการประเมินความชอบ พบว่าผู้เชี่ยวชาญชอบผลิตภัณฑ์ชาหมักจากท้องตลาด ซึ่งอาจเกิดจาก มีความเข้มข้นของกลิ่นแอซิติกและกลิ่นหมักน้อยลงจากการปรุงแต่งกลิ่นรส ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสชี้ให้เห็นแนวทางในการปรับแต่งกลิ่นเพื่อใช้ในการปรับปรุงผลิตภัณฑ์ต่อไป

ภาพที่ 4.10 (เรียงลำดับจากซ้ายไปขวา) ภาพเครื่องดื่มชาหมักจากใบอ่อนที่ไม่เติม DAP (no DAP) และเติม DAP (DAP), ชาหมักจากชาดำ (Black tea) และชาหมักจากท้องตลาดยี่ห้อ A และ B

บทที่ 5
สรุปผลและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาพบว่าตัวอย่างเครื่องดื่มชาหมักจากใบอ่อนที่เติม DAP มีค่า pH, ปริมาณกรดทีอ่ ไตเตรตได้, ปริมาณกรดที่ระเหยได้, ปริมาณแอลกอฮอล์ และปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่แตกต่างจากตัวอย่างชาหมักที่ไม่เติม DAP อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันและสารประกอบฟีนอลทั้งหมดของชาหมักพบว่าไม่มีความแตกต่างกับชาใบอ่อนก่อนการหมัก ($p > 0.05$) และจากการประเมินความชอบของผู้ทดสอบ (9-point hedonic) ต่อชาหมัก 5 ตัวอย่างได้แก่ ชาหมักจากใบอ่อนที่เติม DAP และไม่เติม DAP, ชาหมักจากชาดำ และ ชาหมักในท้องตลาด A และ B พบว่าผู้ทดสอบให้การยอมรับทั้ง 5 ตัวอย่าง (คะแนนมากกว่า 5) โดยผู้ทดสอบชอบชาหมักในท้องตลาดมากที่สุดทั้งในด้านกลิ่น รสชาติและลักษณะปรากฏ จากการประเมินคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสเชิงพรรณนาพบว่าชาหมักในท้องตลาดมีความเข้มของกลิ่นน้ำส้มสายชูและกลิ่นหมักที่ต่ำกว่า และมีกลิ่นหวานที่สูงกว่าตัวอย่างชาหมักจากใบอ่อนและชาหมักจากชาดำจึงสามารถใช้ข้อมูลลักษณะทางประสาทสัมผัสนี้ในการพัฒนาเครื่องดื่มชาหมักให้ตรงความต้องการของผู้บริโภคต่อไป

5.2 ข้อเสนอแนะ

หัวเชื้อ Kombucha (SCOBY) ที่ใช้ควรมีการตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณจุลินทรีย์เพื่อที่จะสามารถจัดสภาวะการหมักให้เหมาะสมกับจุลินทรีย์ชนิดนั้น และทราบว่าลักษณะกลิ่นรสที่ไม่เป็นที่ยอมรับเกิดจากจุลินทรีย์หรือกระบวนการเมทาบอลิซึมใด เพื่อใช้ในการแก้ปัญหาด้านกลิ่นรสของเครื่องดื่มชาหมักให้เป็นที่ยอมรับต่อไป

บรรณานุกรม

กองควบคุมอาหาร สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา.(2549). แนวทางการพิจารณาอาหารประเภท“ชาสมุนไพร”.[ออนไลน์].แหล่งที่มา:http://food.fda.Moph.go.th/Rules/dataRules/3HerbalTea.Pdf. [25 มีนาคม 2564]

จิระนิล แจ่มเกิด.(2563), การปลูกองุ่นทำไมต้องใช้ต้นตอ. สถาบันวิจัยพื้นที่สูง. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา https://www.hrdi.or.th/Articles/Detail/56. [25 มีนาคม 2564]

เฉลิมขวัญ จันดี. (2559), พฤกษเคมี ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านแบคทีเรียของสารสกัดองุ่นป่า (Ampelocissus martini planch). มหาวิทยาลัยบูรพา.

ณรงค์ ชัยเลิศ.ปัจจัยที่จำเป็นต่อการเจริญของยีสต์ วิชาเทคโนโลยีพื้นบ้าน.มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: https://www.classstart.org/classes/74. [25 มีนาคม 2564]

ธรรณพ เหล่ากุลดิลก, สารต้านออกซิเดชันในอาหาร : วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 1 (กรุงเทพ : แดเน็กซ์อินเตอร์คอร์เปอเรชัน, 2564), หน้า 295.

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และ นิธิยา รัตนาปนนท์. DPPH assay/การวิเคราะห์การเป็นสารต้านออกซิเดชัน. Foodnetworksulution.[ออนไลน์].แหล่งที่มา:http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/3200/dpph-assay. [25 มีนาคม 2564]

ศรายุทธ แวดไธสง. (2562). การพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มชาจากใบองุ่นอัดแก๊ส. รายงานปฏิบัติสหกิจศึกษา มหาวิทยาลัยบูรพา.

สถาบันชาและกาแฟแห่งมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง.กระบวนการผลิตชา [ออนไลน์]. https://teacoffee.mfu.ac.th/tc-tea-coffeeknowledge/tc-tea/tc-teaproductionprocess.html. [25 มีนาคม 2564]

อนงนาฎ ไพนุพงศ์. (2017). อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ. PKRU SciTech JOURNAL,1(2),20-27.

Amarowicz, R., Narolewska, O., Karamac, M., Kosinska, A., & Weidner, S. (2008). Grapevine leaves as a source of natural antioxidants. Journal of food and nutrition sciences. 58: 73-78.

Borai, I.H., Ezra, M.K., Rizk, M.Z., Aly, H.F. El-Sherbiny, M., Matloub, A.A., & Fouad, G.I. (2017). Therapeutic impact of grave leaves polyphenols on certain biochemical and peurological markers in $AlCl_3$-induced Alzheimer’s disease. Biomedicine & Phamacotherapy . 93: 837-851.

Cowey, G. 2018. Ask the AWRI: Winemaking with high pH, high TA and high potassium fruit *Aust. N.Z.* Grapegrower Winemaker. 657: 80-81.

Dávila, I., Robles, E., Egüés, I., Labidi, J., Gullón, P. (2017). The biorefinery concept for the valorization of grape processing by-Products, in Handbook of grape processing by-products.C.M. Galanakis (Ed.). Academic Press. 29-53

Farhadi, K., Esmaeilzadeh, F., Hatami, M., Forough, M., & Molaie, R. (2016). Determine of pheno -lic compounds content and antioxidant activity in skin, pulp, seed, cane and leaf of five native grape cultivars in West Azerbaijan province, Iran. Food chemistry. 199: 847-855.

Fontana, A.R., Antoniolli, A.l., & Botini, R. (2018). Development of a high-performance liquid chromatography method base on a core-shell column approach for the rapid deter -mination of multiclass polyphenol in grape pomaces. Food chemistry. 192: 1-8

Gaggia, F., Bagffoni, L., Galino, M., Nielsen, D.S., Jakobsen R.R., Castro-Mejia, J.L., Bosi, S., Truzzi, F., Musumesi, F., Dinelli, G. & Gioia, D.D. (2019). Kombucha beverage from green, black and rooibos teas: A comparative study looking at microbiology, Chemistry and antioxidant activity. Nutrients. 11(1)

Garber Ahmed, G.H., Gonzalez, A.F., & Diaz Garcia, M.E. (2020). Nano-encapsulation of grape and apple pomace phenolic extract in chitosan and soy protein via nano emulsifi- cation. Food Hydrocolloids. 108: 1-10.

Jakubczyk, K., Kaldunska, J., Kochman, J. & Janda, K. (2020). Chemical profile and antioxidant activity of the kombucha beverage derived from white, green, black and red tea. Antioxidant. 9:447

Jin, Q., Chen, L., Li, Z., & Li, J. (2015). Effect of Diammonium Phosphate Supplementation on the Amino Acid Metabolism during Fermentation and Sensory Properties of Fresh Spine Grape (Vitis davidii Foex) Wine. Food science and biotechnology. 24(6): 2051-2057

Joshi, V.K. & Kumar, V. (2017). Influence of different sugar sources, nitrogen sources and inocula on the quality characteristics of apple tea wine. Institute of Brewing & Distilling. 123: 268–276

Kallel, L., Desseaux, V., Hamdi, M., Stocker, P. & Ajandouz, E.H. (2012). Insights into the fermentation biochemistry of kombucha teas and potential impacts of kombucha drinking on starch digestion. Food Research international. 49: 226-232

Leal Martínez, J., Suárez, L.V., Jayabalan, R., Oros, J.H., & Escalante-Aburto, A. (2018). A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites. CyTA-Journal of Food. 16(1): 390-399.

Malbasa, R., Loncar, E., Djuric, M., Klasnja, M., Kolarov, LJ. & Markov, S. (2006). Scale-up of black tea batch fermentation by kombucha. Food and bioproducts Processing, 84(C3): 193-199

Miller, G.L. (1959). Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical chemistry. 31(3): 426-428.

Nworie, K.M. & Okorie, N.A. (2018). Phytochemicals distribution and antioxidant potential of *Bauhinia monandra* (Linn.) leaves extract. Research journal of Medicinal. 12: 78-83

Quito-Won, M.E., & Teves, F.G. (2018). Characteristics of Kombucha Fermentation from Different Substrates and Cytotoxicity of Tea Broth. Sustainable Food Production. 4: 11-19.

Skocińska, K.N., Sionek, B., Scibisz, I. & Krajewska, D.K. (2017). Acid contents and the effect of fermentation condition of Kombucha tea beverages on physicochemical, microbiological and sensory properties. CyTA - Journal of Food. 15(4): 601–607

Specht, G. (2010). Yeast fermentation management for improved wine quality. Woodhead Publishing Limited. 1-33

Tran,T., Grandvalet, C., Verdier, F., Martin, A., Alexandre, H. & Maréchal, R.T. (2020). Microbial dynamics between yeasts and acetic acid bacteria in kombucha: Impacts on the chemical composition of the beverage. Foods. 9(963)

Ugliano, M., Henschke, P.A., Herderich MJ., Pretorius I.S. (2017). Nitrogen management is critical far wine flavour and style. Wine industry journal. 22(6): 24-30

Venkitasamy, C., Zhao, L., Zhang, R., & Pan, Z. (2019). Grape Integrated Processing Technologies for Food and Agricultural By-Products. 133-158.

Villarreal-Soto, S.A., Beaufort S., Bouajila, J., Souchard, J.P., & Taillandier, P. (2018). Understandng Kombucha Tea Fermentation: A Review. 83(3): 580-588

Villarreal-Soto, S.A., Beaufort S., Bouajila, J., Souchard, J.P., Reynard, T., Rollan, S., & Taillandier, P. (2019). Impact of fermentation conditions on the production of bioac -tive compounds with anti-cancer, anti-inflammatory and antioxidant properties in kombucha tea extracts. Process Biochemistry. 83: 44-54.

Vilanova, M., Ugliano, M., Varela, C., Siebert, T., Pretorius, I.S., Henschke, P.A. (2007). Assimilable nitrogen utilisation and production of volatile and non-volatile compounds in chemically defined medium by Saccharomyces cerevisiae wine yeasts. Apply microbial and cell physilogy. 77: 145-157

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

แบบทดสอบทางประสาทสัมผัส

โดยวิธี 9-Point Hedonic Scale

Name : _____ **Date : _____**

<u>คำชี้แจง :</u> ให้ทำการทดสอบชิมผลิตภัณฑ์ตัวอย่างตามรหัสจากซ้ายไปขวา แล้วให้คะแนนความชอบ ในแต่ละด้าน ส่วนในช่องการยอมรับ ให้ทำเครื่องหมาย√ / X ในช่องการยอมรับ เมื่อ √ = ยอมรับโดยรวมทั้งสี กลิ่นและรสชาติ , X = ไม่ยอมรับหรือไม่ชอบ โดยมีคะแนนความชอบจาก 1-9 ดังนี้

9 = ชอบมากที่สุด 8 = ชอบมาก 7 = ชอบปานกลาง

6 = ชอบเล็กน้อย 5 = เฉย ๆ 4 = ไม่ชอบเล็กน้อย

3 = ไม่ชอบปานกลาง 2 = ไม่ชอบมาก 1 = ไม่ชอบมากที่สุด

Product	Aroma	Appearance	Taste	Overall Liking	Acceptable √ / X	Comment
1						
2						

ภาคผนวก ข

แบบทดสอบคุณลักษณะทางประสาทสัมผัส

Name : _____ **Date : _____**

คำชี้แจง : ให้พูดทดสอบทำการให้เครื่องหมาย (mark) ลงไปบนเส้นตรง ณ จุดที่คิดว่าบ่งบอกปริมาณหรือความเข้มที่รับรู้ได้ใน attribute นั้น ๆ (intensity scale value 0-15)

Aroma

Acetic _____

Ferment _____

Sweet _____

Taste

Sour _____

Sweet _____

ภาคผนวก ค

ผลการทดสอบการยอมรับของเครื่องดื่มชาหมัก

ตารางที่ ค-1 ผลการยอมรับด้านกลิ่น acetic ของเครื่องดื่มชาหมัก

ผู้ทดสอบชิม	DAP	No DAP	Black Tea	A	B
1	3.67	3.33	4	4	5
2	2.33	2.67	2	4	3
3	2.67	2.67	2	4	5
4	2.33	3.33	4	5	4
5	4.33	1.33	5	4	5
6	3.33	3.33	4	4	5
7	2.00	2.33	2	4	5
Mean ± SD	2.95 ± 0.85	2.71 ± 0.73	3.29 ± 1.25	4.14 ± 0.38	4.57 ± 0.79

ตารางที่ ค-2 ผลการยอมรับด้านลักษณะปรากฏ ของเครื่องดื่มชาหมัก

ผู้ทดสอบชิม	DAP	No DAP	Black Tea	A	B
1	2.00	2.00	4	4.5	2
2	2.33	2.67	2	4	3
3	3.00	3.00	3	4	4
4	2.33	3.67	3	5	3
5	3.00	3.00	4	3	3
6	4.00	3.67	4	4	2
7	2.00	2.67	2	4	2
Mean ± SD	2.67 ± 0.72	2.95 ± 0.59	3.14 ± 0.90	4.07 ± 0.61	2.71 ± 0.76

ตารางที่ ค-3 ผลการยอมรับด้านรสชาติ ของเครื่องดื่มชาหมัก

ผู้ทดสอบชิม	DAP	No DAP	Black Tea	A	B
1	4.17	3.83	4	3	4
2	2.00	3.33	3	2	2
3	3.33	3.00	3	4	4
4	3.00	4.00	3	5	4
5	2.33	3.00	1	4	4
6	3.00	3.67	2	4	5
7	2.33	3.67	2	3	3
Mean ± SD	2.88 ± 0.74	3.50 ± 0.40	2.57 ± 0.98	3.57 ± 0.98	3.71 ± 0.95

ตารางที่ ค-4 ผลการยอมรับด้านความชอบโดยรวม ของเครื่องดื่มชาหมัก

ผู้ทดสอบชิม	DAP	No DAP	Black Tea	A	B
1	4.50	4.33	4	3	4
2	2.00	3.33	3	2	2
3	3.33	3.00	3	4	4
4	3.00	3.67	3	5	4
5	2.00	2.33	2	3	4
6	3.33	3.33	3	4	5
7	2.33	3.00	2	3	3
Mean ± SD	2.93 ± 0.90	3.29 ± 0.62	2.86 ± 0.69	3.43 ± 0.98	3.71 ± 0.95

ภาคผนวก ง

ผลการทดสอบคุณลักษณะทางประสาทสัมผัส

ตารางที่ ง-1 ผลการทดสอบคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่น acetic ของเครื่องดื่มชาหมัก

ผู้ทดสอบชิม	DAP	No DAP	Black Tea	A	B
1	8.44	10.06	8.18	4.87	7.79
2	8.25	8.96	8.77	1.75	6.16
3	10.91	10.33	11.49	0.58	5.45
4	10.85	9.28	9.55	8.38	0.58
5	3.18	3.05	2.73	1.36	0
Mean ± SD	8.32 ± 4.41	8.34 ± 4.34	8.14 ± 4.43	3.39 ± 3.21	4.00 ± 3.53

ตารางที่ ง-2 ผลการทดสอบคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นหมักของเครื่องดื่มชาหมัก

ผู้ทดสอบชิม	DAP	No DAP	Black Tea	A	B
1	6.36	5.26	4.87	2.73	2.53
2	7.53	7.79	7.21	2.14	6.82
3	9.68	10.06	10.32	1.56	5.06
4	9.87	8.18	12.27	9.74	0.78
5	4.16	3.44	3.9	0	0
Mean ± SD	7.52 ± 3.74	6.95 ± 3.67	7.71 ± 3.19	3.23 ± 4.36	3.04 ± 4.14

ตารางที่ ง-3 ผลการทดสอบคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นหวานของเครื่องดื่มชาหมัก

ผู้ทดสอบชิม	DAP	No DAP	Black Tea	A	B
1	5.91	5.78	6.82	9.94	7.79
2	0.00	0.00	0	0	0
3	0.00	0.00	0	12.08	11.1
4	6.43	0.78	6.43	11.3	9.35
5	0.00	0.00	0	3.31	3.31
Mean ± SD	2.47 ± 3.19	1.31 ± 2.32	2.65 ± 3.70	7.33 ± 4.92	6.31 ± 4.51

ตารางที่ ง-4 ผลการทดสอบคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นชาของเครื่องดื่มชาหมัก

ผู้ทดสอบชิม	DAP	No DAP	Black Tea	A	B
1	8.44	9.87	8.77	11.69	9.55
2	0.00	0.00	0	0	7.01
3	0.00	0.00	0	0	0
4	0.45	2.60	6.04	1.36	3.12
5	0.00	0.00	2.53	0	0
Mean ± SD	1.78 ± 3.17	2.49 ± 3.70	3.47 ± 3.74	2.61 ± 5.48	3.94 ± 4.78

ตารางที่ ง-5 ผลการทดสอบคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสด้านรสเปรี้ยวของเครื่องดื่มชาหมัก

ผู้ทดสอบชิม	DAP	No DAP	Black Tea	A	B
1	4.35	3.70	4.87	8.57	10.32
2	7.14	4.81	5.26	6.43	7.01
3	6.30	5.26	7.21	7.6	4.87
4	12.01	8.70	9.16	11.3	8.38
5	5.45	3.83	3.51	2.53	2.92
Mean ± SD	7.05 ± 3.60	5.26 ± 2.57	6.00 ± 2.02	7.29 ± 3.08	6.70 ± 3.13

ตารางที่ ง-6 ผลการทดสอบคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสด้านรสหวานของเครื่องดื่มชาหมัก

ผู้ทดสอบชิม	DAP	No DAP	Black Tea	A	B
1	9.87	9.93	8.77	7.79	8.77
2	4.80	5.97	4.87	2.73	2.53
3	5.26	8.05	5.45	6.62	5.65
4	9.22	7.01	9.74	5.84	7.21
5	5.39	7.86	2.92	7.01	1.56
Mean ± SD	6.91 ± 3.27	7.77 ± 3.14	6.35 ± 2.55	6.00 ± 2.39	5.14 ± 3.63

ภาคผนวก จ

ผลวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ตารางที่ จ-1 ผลการวิเคราะห์วิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่ในเครื่องดื่มชาหมักที่เติมและไม่เติม DAP (วันที่ 1 ถึงวันที่ 21)

ANOVA

Source of Variation	*SS*	*df*	*MS*	*F*	*P-value*	*F crit*
Between Groups	1255.50605	1	1255.50605	5.3822	0.03	4.493998478
Within Groups	3732.30224	16	233.26889			
Total	4987.80829	17				

ตารางที่ จ-2 ผลการวิเคราะห์วิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณแอลกอฮอล์ในเครื่องดื่มชาหมักที่เติมและไม่เติม DAP (วันที่ 1 ถึงวันที่ 21)

ANOVA

Source of Variation	*SS*	*df*	*MS*	*F*	*P-value*	*F crit*
Rows	0.08089074	1	0.08089074	61.6093089	0.01584653	18.5128205
Columns	0.06747778	2	0.03373889	25.696756	0.03745773	19
Error	0.00262593	2	0.00131296			
Total	0.15099444	5				

ตารางที่ จ-3 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่า pH ในเครื่องดื่มชาหมักที่เติมและไม่เติม DAP (วันที่ 1 ถึงวันที่ 21)

ANOVA

Source of Variation	*SS*	*df*	*MS*	*F*	*P-value*	*F crit*
Rows	1.1449	1	1.1449	97.3922495	2.334E-05	5.591447851
Columns	1.17420833	7	0.16774405	14.2693424	0.00117517	3.78704354
Error	0.08228889	7	0.01175556			

ตารางที่ จ-4 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ในเครื่องดื่มชาหมักที่เติมและไม่เติม DAP (วันที่ 1 ถึงวันที่ 21)

ANOVA

Source of Variation	*SS*	*df*	*MS*	*F*	*P-value*	*F crit*
Rows	0.85229824	1	0.85229824	6.08475699	0.04303871	5.59144785
Columns	18.8503667	7	2.69290953	19.2253126	0.00045391	3.78704354
Error	0.98049728	7	0.14007104			
Total	20.6831622	15				

ตารางที่ จ-5 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรดอะซิติกในเครื่องดื่มชาหมักที่เติมและไม่เติม DAP (วันที่ 1 ถึงวันที่ 21)

ANOVA

Source of Variation	*SS*	*df*	*MS*	*F*	*P-value*	*F crit*
Rows	5.38266778	1	5.38266778	8.18354524	0.04589753	7.70864742
Columns	10.6483667	4	2.66209167	4.04731417	0.10220651	6.38823291
Error	2.63097111	4	0.65774278			
Total	18.6620056	9				

ตารางที่ จ-6 ผลทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดในเครื่องดื่มชาหมักที่เติม DAP ก่อนและหลังการหมัก

	Mean	S.D.	ผลต่างของค่าเฉลี่ย	t	df	Sig. (2-tailed)
ก่อนหมัก	148.56	2.12	4.95000	2.595	2	0.112
หลังหมัก	138.28	3.98				

ตารางที่ จ-7 ผลทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดในเครื่องดื่มชาหมักที่ไม่เติม DAP ก่อนและหลังการหมัก

	Mean	S.D.	ผลต่างของค่าเฉลี่ย	t	df	Sig. (2-tailed)
ก่อนหมัก	144.85	2.24	5.25667	1.136	2	0.374
หลังหมัก	139.6	7.91				

ตารางที่ จ-8 ผลทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในเครื่องดื่มชาหมักที่เติม DAP ก่อนและหลังการหมัก

	Mean	S.D.	ผลต่างของค่าเฉลี่ย	t	df	Sig. (2-tailed)
ก่อนหมัก	88.98	0.38	15.37667	2.712	2	0.113
หลังหมัก	73.61	10.15				

ตารางที่ จ-9 ผลทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในเครื่องดื่มชาหมักที่ไม่เติม DAP ก่อนและหลังการหมัก

	Mean	S.D.	ผลต่างของค่าเฉลี่ย	t	df	Sig. (2-tailed)
ก่อนหมัก	87.69	0.68	2.38000	1.706	2	0.230
หลังหมัก	85.31	1.74				

ตารางที่ จ-10 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยคะแนนการยอมรับด้านความชอบโดยรวม ของเครื่องดื่มชาหมักที่เติมและไม่เติม DAP, เครื่องดื่มชาหมักจากชาดำ, เครื่องดื่มชาหมักจากท้องตลาดยี่ห้อ A และ B

ANOVA

Source of Variation	*SS*	*df*	*MS*	*F*	*P-value*	*F crit*
Between Groups	11.4788571	4	2.86971429	1.25346312	0.30991837	2.68962757
Within Groups	68.6828571	30	2.28942857			
Total	80.1617143	34				

ตารางที่ จ-11 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยคะแนนการยอมรับด้านลักษณะปรากฏ ของเครื่องดื่มชาหมักที่เติมและไม่เติม DAP, เครื่องดื่มชาหมักจากชาดำ, เครื่องดื่มชาหมักจากท้องตลาดยี่ห้อ A และ B

ANOVA

Source of Variation	*SS*	*df*	*MS*	*F*	*P-value*	*F crit*
Between Groups	29.5611429	4	7.39028571	4.36	0.01	2.69
Within Groups	50.8885714	30	1.69628571			
Total	80.4497143	34				

ตารางที่ จ-12 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยคะแนนการยอมรับด้านกลิ่น ของเครื่องดื่มชาหมักที่เติมและไม่เติม DAP, เครื่องดื่มชาหมักจากชาดำ, เครื่องดื่มชาหมักจากท้องตลาดยี่ห้อ A และ B

ANOVA

Source of Variation	*SS*	*df*	*MS*	*F*	*P-value*	*F crit*
Between Groups	57.1268571	4	14.2817143	6.14380531	0.00098048	2.68962757
Within Groups	69.7371429	30	2.32457143			
Total	126.864	34				

ตารางที่ จ-13 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยคะแนนการยอมรับด้านรส ของเครื่องดื่มชาหมักที่เติมและไม่เติม DAP, เครื่องดื่มชาหมักจากชาดำ, เครื่องดื่มชาหมักจากท้องตลาดยี่ห้อ A และ B

ANOVA

Source of Variation	*SS*	*df*	*MS*	*F*	*P-value*	*F crit*
Between Groups	22.1811429	4	5.54528571	2.44	0.07	2.69
Within Groups	68.2457143	30	2.27485714			
Total	90.4268571	34				

ตารางที่ จ-14 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นกรดน้ำส้มของเครื่องดื่มชาหมักที่เติมและไม่เติม DAP, เครื่องดื่มชาหมักจากชาดำ, เครื่องดื่มชาหมักจากท้องตลาดยี่ห้อ A และ B

ANOVA

Source of Variation	*SS*	*df*	*MS*	*F*	*P-value*	*F crit*
Between Groups	113.4256854	4	28.35642135	2.47	0.08	2.87
Within Groups	229.27001	20	11.4635005			
Total	342.6956954	24				

ตารางที่ จ-15 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นหมักของเครื่องดื่มชาหมักที่เติมและไม่เติม DAP, เครื่องดื่มชาหมักจากชาดำ, เครื่องดื่มชาหมักจากท้องตลาดยี่ห้อ A และ B

ANOVA

Source of Variation	*SS*	*df*	*MS*	*F*	*P-value*	*F crit*
Between Groups	110.420512	4	27.605128	2.90	0.05	2.87
Within Groups	190.3577993	20	9.517889963			
Total	300.7783112	24				

ตารางที่ จ-16 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นหวานของเครื่องดื่มชาหมักที่เติมและไม่เติม DAP, เครื่องดื่มชาหมักจากชาดำ, เครื่องดื่มชาหมักจากท้องตลาดยี่ห้อ A และ B

ANOVA

Source of Variation	*SS*	*df*	*MS*	*F*	*P-value*	*F crit*
Between Groups	120.0872844	4	30.02182109	2.81	0.05	2.87
Within Groups	213.3522793	20	10.66761396			
Total	333.4395636	24				

ตารางที่ จ-17 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสด้านรสเปรี้ยวของเครื่องดื่มชาหมักที่เติมและไม่เติม DAP, เครื่องดื่มชาหมักจากชาดำ, เครื่องดื่มชาหมักจากท้องตลาดยี่ห้อ A และ B

ANOVA

Source of Variation	*SS*	*df*	*MS*	*F*	*P-value*	*F crit*
Between Groups	13.68946475	4	3.422366188	0.47	0.76	2.87
Within Groups	145.8618137	20	7.293090684			
Total	159.5512784	24				

ตารางที่ จ-18 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสด้านรสหวานของเครื่องดื่มชาหมักที่เติมและไม่เติม DAP, เครื่องดื่มชาหมักจากชาดำ, เครื่องดื่มชาหมักจากท้องตลาดยี่ห้อ A และ B

ANOVA

Source of Variation	*SS*	*df*	*MS*	*F*	*P-value*	*F crit*
Between Groups	19.28016294	4	4.820040735	0.82	0.53	2.87
Within Groups	116.9393007	20	5.846965036			
Total	136.2194637	24				

ตารางที่ จ-19 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นชาของเครื่องดื่มชาหมักที่เติมและไม่เติม DAP, เครื่องดื่มชาหมักจากชาดำ, เครื่องดื่มชาหมักจากท้องตลาดยี่ห้อ A และ B

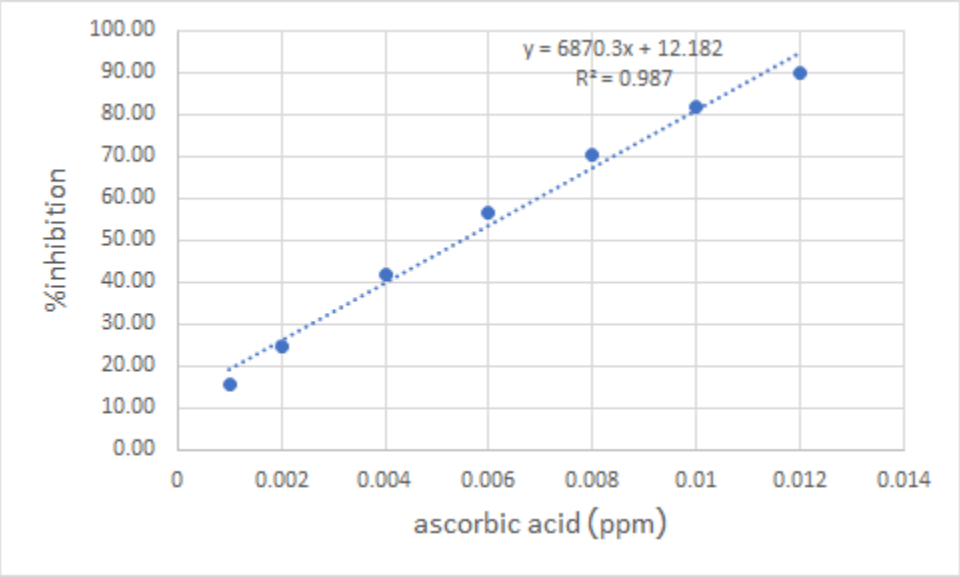
ANOVA

Source of Variation	*SS*	*df*	*MS*	*F*	*P-value*	*F crit*
Between Groups	12.87904832	4	3.21976208	0.18	0.95	2.87
Within Groups	357.1033978	20	17.85516989			
Total	369.9824461	24				

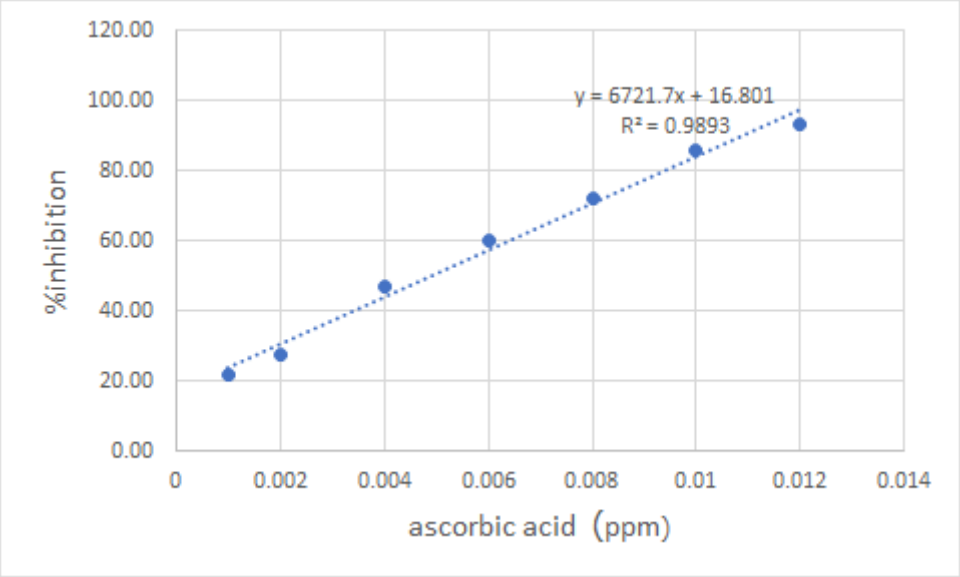
ภาคผนวก ฉ

กราฟมาตรฐาน

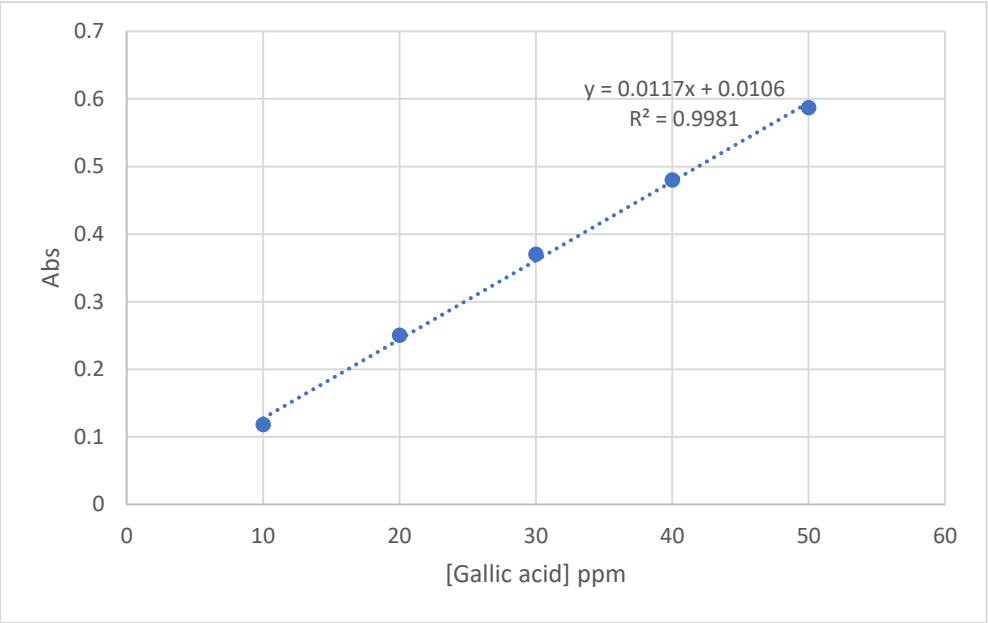
ภาพที่ ฉ-1 กราฟมาตรฐานปริมาณความเข้มข้นของ Ascorbic acid (mM) ในการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของชาก่อนเข้าสู่กระบวนการหมัก



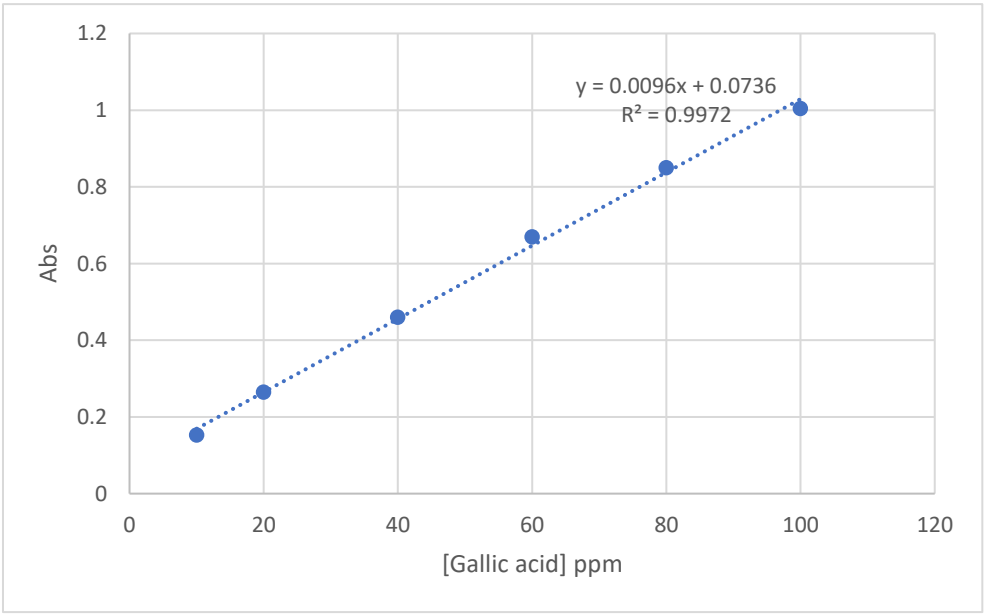
ภาพที่ ฉ-2 กราฟมาตรฐานปริมาณความเข้มข้นของ Ascorbic acid (mM) ในการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของชาหมัก



ภาพที่ ฉ-3 ภาพแสดงกราฟมาตรฐานปริมาณความเข้มข้นของ Gallic acid (ppm) ในการ วิเคราะห์หาปริมาณของสารประกอบฟีนอลทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu ของชาก่อนเข้าสู่กระบวนการหมัก



ภาพที่ ฉ-4 กราฟมาตรฐานกราฟมาตรฐานปริมาณความเข้มข้นของ Gallic acid (ppm) ในการ วิเคราะห์หาปริมาณของสารประกอบฟีนอลทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu ของชาหมัก



ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	นางสาวนันท์นภัส พิสิษฐ์อาภาภัค
ตำแหน่ง	หัวหน้าโครงการ
วุฒิการศึกษา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ.)
ภาควิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีที่สำเร็จการศึกษา	2564
โทรศัพท์	097-0132136
E-mail	6032534823@student.chula.ac.th

ชื่อ-สกุล	นางสาวศุภาพิชญ์ ทองรัตน์
ตำแหน่ง	ผู้วิจัยร่วม
วุฒิการศึกษา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ.)
ภาควิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีที่สำเร็จการศึกษา	2564
โทรศัพท์	088-5614971
E-mail	6032568123@student.chula.ac.th