การผลิตน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียว

Vinegar production from green tea leaves

ธรากร บุษยบริบูรณ์โชติ

ไพลิน ศรีโยหะ

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรมอาหาร

คณะอุตสาหกรรมอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง พ.ศ. 2566

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

การผลิตน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียว

Vinegar production from green tea leaves

จัดทำโดย

ธรากร บุษยบริบูรณ์โชติ รหัสนักศึกษา 62080097

ไพลิน ศรีโยหะ รหัสนักศึกษา 62080122

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

.....

11 / 2ก / 2566

(ศ.ดร.วราวุฒิ ครูส่ง)

อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อปัญหาพิเศษ	การผลิตน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียว
ชื่อนักศึกษา	ธรากร บุษยบริบูรณ์โชติ รหัสนักศึกษา 62080097
	ไพลิน ศรีโยหะ รหัสนักศึกษา 62080122
หลักสูตร	วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรมอาหาร
พ.ศ.	2566
อาจารย์ที่ปรึกษา	ศ.ดร.วราวุฒิ ครูส่ง

บทคัดย่อ

ชาเขียวมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Camellia sinensis* ชาชนิดนี้จะไม่ผ่านขั้นตอนการหมัก จึงทำให้ใบชามีสารประกอบฟีนอลหลงเหลืออยู่มากกว่าใบชาชนิดอื่นๆ เช่น สารอีพิกัลโลคาเทชินกัลเลตซึ่งพบมากที่สุดในชาเขียวมีความสำคัญในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และสารสำคัญที่สามารถพบได้ในชาเขียว เช่น กรดอะมิโน วิตามิน B C และ E จึงสนใจศึกษาการนำใบชาเขียวที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน 0.25 0.50 0.75 และ 1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) มาหมักเป็นน้ำส้มสายชูโดยเชื้อ *Acetobacter aceti* WK สำหรับการผลิตน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียวจะเป็นการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง ในช่วงเริ่มต้นการหมักน้ำส้มสายชูจะทำการปรับความเข้มข้นทั้งหมด (Total concentration; TC) เท่ากับ 80 กรัม/ลิตร ซึ่งประกอบด้วย กรดอะซิติก 45 กรัม/ลิตร และแอลกอฮอล์ 35 กรัม/ลิตร เติมสารอาหารหมักในสภาพมีอากาศทั้งหมดสามรอบการหมัก และเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณกรด น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด และปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียวแต่ละความเข้มข้น พบว่าน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียวความเข้มข้น 0.75% (น้ำหนัก/ปริมาตร) มีอัตราการผลิตกรดอะซิติก (Acetification rate; ETA) มากที่สุดเท่ากับ 0.106±0.015 กรัม/ลิตร/วัน และมีปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งมากที่สุดเท่ากับ 382.07±142.904 มิลลิกรัม/ลิตร การวิเคราะห์ปริมาณโพลิฟีนอลทั้งหมด น้ำส้มสายชูที่มีปริมาณโพลิฟีนอลมากที่สุด คือ น้ำส้มสายชูจากใบชาเขียวความเข้มข้น 1% (ปริมาตร/น้ำหนัก) เท่ากับ 363.72±7.789 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สอดคล้องกับการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งมีค่า IC_{50} (50% Inhibitory Concentration) เท่ากับ 1.341±0.091 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special problem title	Vinegar production from green tea leaves
Student name	Tharakorn Bussayaboriboonchote Student ID 62080097
	Pailin Sriyoha Student ID 62080122
Program	Bachelor of Science in Fermentation Technology in food industry
Year	2023
Advisor	Prof.Dr. Warawut Krusong

ABSTRACT

Green tea (*Camellia sinensis*) is not fermented product. Normally, tea leaves contain more phenolic compounds, such as epigallocatechin gallate, which is found abundantly in green tea. It is important in antioxidant activity. The other important substances that can be found in green tea are amino acids and vitamins consisting vitamin B, C and E. In this study, different concentrations of green tea 0.25, 0.50, 0.75 and 1% (w/v) were used for vinegar production by *Acetobacter aceti* WK in semi-continuous fermentation process. At the beginning of the fermentation, the fermenting mash was adjusted to a total concentration (TC) of 80 (g/L), consisting of 45 (g/L) acetic acid and 35 (g/L) alcohol. Supplemented with nutrients fermented in aerobic conditions for three fermentation cycles. Collected samples were analyzed for acid content, cell dry weight, total polyphenol content and antioxidant content in each concentration of green tea leaf vinegar samples. It was found that green tea vinegar at 0.75% (w/v) concentration provided the highest acetification rate (ETA) at 0.106±0.015 g/L/day. The highest cell dry weight was 382.07±142.904 mg/l. Analysis of total polyphenol content, the vinegar containing the highest polyphenol content obtained from 1% (w/v) concentration of green tea, which equaled to 363.72±7.789 mg/mL. This is consistent with the antioxidant analysis, which has an IC_{50} (50% Inhibitory Concentration) value of 1.341±0.091 mg/mL.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาปัญหาพิเศษเรื่อง "การผลิตน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียว" สำเร็จลุล่วงตามวัตถุประสงค์และเป้าหมาย เนื่องด้วยความเมตตาและเอาใจใส่จากบุคคลทั้งหลายโดยได้รับความกรุณาจาก ศ.ดร.วราวุฒิ ครูส่ง ที่ท่านสละเวลารับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษางานวิจัยนี้ กรุณาสละเวลาอันมีค่าคอยให้ความช่วยเหลือ ให้ความรู้และคำแนะนำตลอดจนแนวทางแก้ไขปัญหาในทุกๆด้าน ด้วยความเอาใจใส่อย่างดียิ่ง เพื่อให้ปัญหาพิเศษฉบับนี้มีความสมบูรณ์และถูกต้องมากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.วิรามศรี ศรีพจนารถ ที่ท่านได้ให้คำแนะนำ คำชี้แนะ การสนับสนุนอย่างดียิ่งในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ นายวรัญญู โตชูวงศ์ และนางสาวธนัณฌา สุมาลัย นักศึกษาระดับปริญญาโท ที่ค่อยให้ความช่วยเหลือและให้คำแนะนำตลอดการทำงานวิจัย รวมทั้งเล่มปัญหาพิเศษฉบับนี้ให้ผ่านลุล่วงไปได้ด้วยดีจนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ครอบครัวของคณะผู้วิจัย และเพื่อนๆ คณะอุตสาหกรรมอาหาร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ความช่วยเหลือและกำลังใจด้วยดีตลอดเวลา

ธรากร บุษยบริบูรณ์โชติ

ไพลิน ศรีโยหะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... II
กิตติกรรมประกาศ..... III
สารบัญ..... IV
สารบัญตาราง..... VI
สารบัญภาพ..... VII
บทที่ 1 บทนำ..... 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา..... 1
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 1
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 2
2.1 น้ำส้มสายชู..... 2
2.2 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการผลิตน้ำส้มสายชู..... 5
2.3 ใบชาเขียว..... 5
2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 6
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง..... 8
3.1 วัตถุดิบและสารเคมี..... 8
3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ..... 9
3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง..... 9
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์..... 14
4.1 ศึกษาประสิทธิภาพการผลิตกรดอะซิติกในน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียว..... 14
4.2 การศึกษาการเจริญของเชื้อ *A. aceti* WK ในน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียว..... 15
4.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดของน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียว..... 16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.4 วิจารณ์ผลการทดลอง..... 17

บทที่ 5 สรุปผลและข้อเสนอแนะ..... 18

5.1 สรุปผลการทดลอง..... 18

5.2 เสนอแนะ..... 18

บรรณานุกรม..... 19

ภาคผนวก..... 23

ภาคผนวก ก รูปภาพ..... 24

ภาคผนวก ข วิธีการวิเคราะห์..... 29

ภาคผนวก ค ข้อมูลผลการทดลอง..... 37

ภาคผนวก ง วิเคราะห์ผลทางสถิติ..... 38

ประวัติผู้เขียน..... 54

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

4.1 อัตราเฉลี่ยการสร้างกรดของน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียวที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน..... 14

4.2 การศึกษาการเจริญของเชื้อ *A. aceti* WK ในน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียว..... 15

4.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด และสารต้านอนุมูลอิสระ..... 16
ของน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียว

ค.1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดในตัวอย่างน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียว..... 37

ค.2 ผลการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียว..... 37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 *Acetobacte*r spp. 5

2.2 ใบชาเขียว..... 6

3.1 กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียว..... 10

3.2 จุดยุติในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดในตัวอย่าง..... 11

3.3 แผ่นอ่านค่ามาตรฐานที่ใช้สำหรับเทียบหาเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์..... 12

ก.1 ขั้นตอนการเตรียมชาเขียว โดยชั่งด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง..... 24

ก.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ..... 24

ก.3 การหมักน้ำส้มสายชูด้วยเชื้อ *A. aceti* WK ในขวดดูแรน..... 25

ก.4 ไทเทรตหาปริมาณกรดในตัวอย่างน้ำส้มสายชู..... 25

ก.5 จุดยุติการไทเทรตหาปริมาณกรดในตัวอย่างน้ำส้มสายชู..... 26

ก.5 การหาปริมาณแอลกอฮอล์ โดยใช้อีบลูลิโอมิเตอร์..... 26

ก.6 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง..... 27

ก.7 การหาปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด โดยใช้เครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (Microplate Reader)..... 27

ก.8 การหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้เครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (Microplate Reader)..... 28

ข.1 กราฟมาตรฐานน้ำหนักเซลล์แห้งของตัวอย่างน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียว 0.25%(w/v)..... 31

ข.2 กราฟมาตรฐานน้ำหนักเซลล์แห้งของตัวอย่างน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียว 0.5%(w/v)..... 31

ข.3 กราฟมาตรฐานน้ำหนักเซลล์แห้งของตัวอย่างน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียว 0.75%(w/v)..... 32

ข.4 กราฟมาตรฐานน้ำหนักเซลล์แห้งของตัวอย่างน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียว 1%(w/v)..... 32

ข.5 กราฟสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก..... 33

ข.6 กราฟสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์..... 35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่ หน้า

ง.1 วิเคราะห์ปริมาณกรดอะซิติกของน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียว..... 38
โดยใช้วิธีหาค่าความแปรปรวน (Analysis of variance, Duncan)
ง.2 วิเคราะห์ปริมาณการผลิตเซลล์ อัตราการผลิตเซลล์..... 40
ของเชื้อ *A. aceti* WK ในการหมักน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียวที่ความเข้มข้นต่างๆ
โดยใช้วิธีหาค่าความแปรปรวน (Analysis of variance, Duncan)
ง.3 วิเคราะห์หาปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด (Total polyphenol)..... 42
โดยใช้วิธีหาค่าความแปรปรวน (Analysis of variance, Duncan)
ง.4 วิเคราะห์หาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidative)..... 48
โดยใช้วิธีหาค่าความแปรปรวน (Analysis of variance, Duncan)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ชาเขียว (Green tea) คือ ชาที่ได้มาจากต้นชา ที่มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Camellia sinensis* ซึ่งชาชนิดนี้จะไม่ผ่านขั้นตอนการหมัก เตรียมได้โดยการนำใบชาสดมาผ่านความร้อนเพื่อทำให้ใบชาแห้งอย่างรวดเร็ว ซึ่งวิธีการก็ คือ เมื่อเก็บใบชามาแล้วก็นำมาทำให้แห้งอย่างรวดเร็วในหม้อทองแดงโดยใช้ความร้อนไม่สูงเกินไป และใช้มือคลึงเบา ๆ ก่อนแห้ง หรืออบไอน้ำในระยะเวลาสั้น ๆ แล้วนำไปอบแห้งเพื่อยับยั้งการทำงานเอนไซม์ (ความร้อนจะช่วยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทำให้ไม่เกิดการสลายตัว) จึงได้ใบชาที่แห้งแต่ยังสดอยู่ และมีสีที่ค่อนข้างเขียว จึงเรียกกันว่า "ชาเขียว" และการที่ใบชาที่ได้นั้นไม่ผ่านขั้นตอนการหมัก จึงทำให้ใบชามีสารประกอบฟีนอล (Phenolic compound) หลงเหลืออยู่มากกว่าในอู่หลงและชาดำ (สองชนิดนี้คือชาที่ผ่านการหมัก) จึงทำให้ชาเขียวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าชาทั้งสอง (Chen et al., 2003)

ในส่วนการผลิตน้ำส้มสายชูเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักกรดอะซิติก โดยเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Acetic acid bacteria ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถออกซิไดซ์เอทานอลให้เปลี่ยนเป็นกรดอะซิติก วัตถุดิบที่นำมาผลิตน้ำส้มสายชูมีหลากหลายชนิด ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้จะใช้วัตถุดิบในการผลิตน้ำส้มสายชู คือ ใบชาเขียวโดยคุณสมบัติของใบชานั้นอุดมไปด้วยสารสำคัญอย่าง คาเทชิน ธีอะนิน และโพลีฟีนอล (Chen et al., 2003) เป็นต้น เมื่อได้ผลิตภัณฑ์น้ำส้มสายชูจึงนำมาวิเคราะห์เพื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของใบชาเขียวที่ผ่านกระบวนการหมัก ในการผลิตกรดอะซิติก สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และสารต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.2.1 เพื่อศึกษาการผลิตน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียว

1.2.2 เพื่อศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและสารต้านอนุมูลอิสระในผลิตภัณฑ์น้ำส้มสายชูจากใบชาเขียว

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 ผลลัพธ์ที่ได้จากการนำใบชาเขียวมาหมักเป็นน้ำส้มสายชู

1.3.2 น้ำส้มสายชูจากใบชาเขียวแห้งที่มีคุณภาพและมีคุณค่าทางโภชนาการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 น้ำส้มสายชู

2.1.1 ความหมายของน้ำส้มสายชู

น้ำส้มสายชูเป็นที่รู้จักมาเป็นเวลานานนิยมใช้เป็นเครื่องปรุงรสอาหาร (Seasoning) ภายในครัวเรือน และใช้กันอย่างแพร่หลายในชีวิตประจำวัน น้ำส้มสายชูได้จากการหมักเอทิลแอลกอฮอล์ในไวน์ด้วยแบคทีเรียในกลุ่ม *Acetobacter* ทำให้ได้กรดน้ำส้ม (Acetic acid) ซึ่งมีรสเปรี้ยว โดยเกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation reaction) น้ำส้มสายชูมี 3 ประเภท (พรพรรณ พัวไพบูลย์, 2560) ได้แก่

1. น้ำส้มสายชูหมัก คือ น้ำส้มสายชูที่ได้จากการหมัก เมล็ดธัญพืช เช่น ข้าว ข้าวโพด ผลไม้ เช่น สับปะรด แอปเปิ้ล มะม่วง เป็นต้น วัตถุดิบที่มีน้ำตาล (Sugar) เช่น ผลไม้ต่างๆ เป็นอาหารของยีสต์ได้โดยตรง ส่วนวัตถุดิบที่มีแป้ง เช่น ข้าว จะต้องผ่านการย่อยให้เป็นโมเลกุลของน้ำตาลก่อนที่เชื้อยีสต์จะนำไปใช้เพื่อผลิตแอลกอฮอล์โดยเฉพาะเอทิลแอลกอฮอล์ต่อไป การผลิตน้ำส้มสายชูหมัก เป็นการหมักสองขั้นตอน คือ การหมักน้ำตาลให้เกิดแอลกอฮอล์ (Alcoholic fermentation) โดยใช้ยีสต์ (Yeast) ตามด้วยการหมักแอลกอฮอล์ให้เกิดกรดอะซิติก (Acetic acid fermentation) ด้วยแบคทีเรียในกลุ่ม *Acetobacter* ในสภาวะที่มีออกซิเจน น้ำส้มสายชูที่ได้จะผ่านการกรองให้ใส ไม่มีตะกอน ยกเว้นตะกอนที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ มีกลิ่นหอมตามกลิ่นของวัตถุดิบ มีรสชาติดี อาจมีรสหวานของน้ำตาลที่ตกค้าง มีกลิ่นของวัตถุดิบที่ใช้ในการหมัก ความเข้มข้นขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณน้ำตาลของวัตถุดิบที่ใช้ในการหมัก ต้องมีปริมาณกรดน้ำส้ม (Acetic acid) ไม่น้อยกว่า 4%

2. น้ำส้มสายชูกลั่น เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำเอทิลแอลกอฮอล์เจือจางมาหมักกับเชื้อน้ำส้มสายชู หรืออาจได้จากการนำน้ำส้มสายชูหมักมากลั่น น้ำส้มสายชูกลั่นจะต้องมีลักษณะใส ไม่มีตะกอน และมีปริมาณกรดน้ำส้มไม่น้อยกว่า 4%

3. น้ำส้มสายชูเทียม เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำเอากรดน้ำส้ม (Glacial acetic acid) ซึ่งสังเคราะห์ขึ้นทางเคมี เป็นกรดอินทรีย์มีฤทธิ์เป็นกรดอ่อนมีความเข้มข้นประมาณ 95% มาเจือจางจนได้ปริมาณกรด 4-7% ลักษณะใส ไม่มีสี กรดน้ำส้มที่นำมาเจือจางจะต้องมีความบริสุทธิ์สูงเหมาะสมที่จะนำมาเป็นอาหารได้ และน้ำที่ใช้เจือจางต้องเหมาะสมที่จะใช้ดื่มได้

2.1.2 กระบวนการหมักน้ำส้มสายชู

การเปลี่ยนแอลกอฮอล์ให้เป็นกรดอะซิติก โดยอาศัยเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม Acetic acid bacteria ทำการหมักในสภาพที่มีอากาศ สำหรับปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้นสามารถแบ่งออกเป็น 3 ขั้น (พรพรรณ พัวไพบูลย์, 2560) ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า การแสวงหากำไร หรือการแสดงความคิดเห็นใดๆ อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนแรกเป็นการเปลี่ยนแอลกอฮอล์ให้เป็นอะเซตัลดีไฮด์ (Acetaldehyde) โดยอาศัยเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรเจนเนส เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ดังนี้

$$2C_2H_5OH + O_2 \longrightarrow 2CH_3CHO + 2H_2O$$

ขั้นตอนที่สองเป็นการเปลี่ยนอะเซตัลดีไฮด์ให้ไปเป็นไฮเดรตอะเซตัลดีไฮด์ (Hydrate acetaldehyde) โดยอาศัยเอนไซม์อะเซตัลดีไฮด์ ดีไฮโดรเจนเนส (Acetaldehyde dehydrogenase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ดังนี้

$$CH_3CHO + H_2O \longrightarrow CH_3\text{-}\overset{OH}{\overset{|}{C}}H\text{-}OH$$

ขั้นตอนที่สามเป็น ขั้นตอนการสร้างกรดอะซิติกโดยที่เกิดปฏิกิริยาการส่งโปรตอน 2 ตัว ของไฮเดรตอะเซทัลดีไฮด์ ไปยังอะตอมของออกซิเจนเกิดกรดอะซิติกออกมา ทั้งนี้ โดยอาศัยเอนไซม์อะซิทัล อัลดีไฮด์ดีไฮโดรเจนเนส (Acctaldehyde dehydrogenase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ดังนี้

$$CH_3\text{-}CH\text{-}OH + O \longrightarrow CH_3COOH + H_2O$$

ส่วนการหมักน้ำส้มสายชูนั้นก็จะมีการหมักหลายแบบเช่น การหมักแบบครั้งเดียว เป็นการหมักที่ไม่มีการเติมอาหารหรือวัตถุดิบอีก และทำการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์น้ำส้มสายชูหลังจากสิ้นสุดกระบวนการหมัก (Arnold et al., 2002 ; Horiuchi et al., 1999) การหมักแบบต่อเนื่องเป็นการหมักที่มีการเติมอาหารหรือวัตถุดิบระหว่างกระบวนการหมัก มีการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ไปพร้อมๆกับการเติมอาหารใหม่ โดยที่มีอัตราการเก็บเกี่ยวเท่ากับอัตราการเติมอาหารใหม่ลงไป (Fregapane et al., 2003) แต่ส่วนใหญ่จะนิยมใช้การหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง เนื่องจากการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องเป็นการหมักที่เลี้ยงโดยมีการเติมอาหารหรือวัตถุดิบระหว่างกระบวนการหมัก เพื่อปรับความเข้มข้นของอาหารที่ใช้เลี้ยงให้คงที่และมีสภาวะที่เหมาะสมต่อกระบวนการหมักมีการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์น้ำส้มสายชูเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก ซึ่งการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องเป็นการประยุกต์การหมักแบบครั้งเดียวกับการหมักแบบต่อเนื่องเข้าด้วยกัน โดยการหมักน้ำส้มสายชูนั้นต้องคำนึงถึงวัตถุดิบตั้งต้นที่ใช้ว่ามีความเข้มข้นของแอลกอฮอล์และความเข้มข้นของกรดอะซิติกนั้นเหมาะสมหรือไม่ โดยปกติแล้วความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ และกรดอะซิติกที่สูงมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ซึ่งความเหมาะสมของความเข้มข้นแอลกอฮอล์ที่ใช้จะอยู่ในช่วงระหว่าง 13 กรัม/ลิตร ความเข้มข้นของกรดอะซิติกจะอยู่ในช่วงระหว่าง 10 กรัม/ลิตร ในการหมักน้ำส้มสายชูเป็นปฏิกิริยาที่ต้องการออกซิเจน เนื่องจากแบคทีเรียที่ผลิตกรดอะซิติกจะออกซิไดซ์แอลกอฮอล์เปลี่ยนไปเป็นกรดอะซิติกในสภาวะที่มีอากาศ โดยปกติแล้วอัตราการไหลของอากาศใช้ที่ 0.2 vvm หรืออัตราการไหลของอากาศ 150 ลิตร/นาที โดยมีความเข้มข้นของออกซิเจนอยู่ที่ 2 มิลลิกรัม/ลิตร ส่วนอุณหภูมิที่ใช้ในการหมักที่เหมาะสมกับแบคทีเรียผลิตกรดน้ำส้มสายชูอยู่ในช่วง 30-31 องศาเซลเซียส สำหรับการเก็บผลิตภัณฑ์น้ำส้มสายชูนั้นจะเก็บในช่วงที่มีความเข้มข้นของกรดอะซิติกอยู่ที่ 70-80 กรัม/ลิตร และความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ไม่เกิน 8 กรัม/ลิตร (de Ory et al., 2002 ; 2004)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3 ประโยชน์จากน้ำส้มสายชู

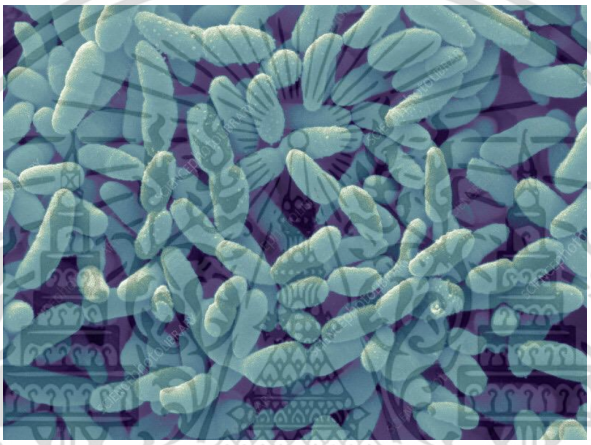
น้ำส้มสายชูหมักช่วยลดระดับน้ำตาล (Kondo et al., 2001) ได้ถึง 30-70 เปอร์เซ็นต์ หลังการรับประทานอาหาร จะช่วยรักษาโรคเบาหวาน เนื่องจากในร่างกายมีฮอร์โมนอินซูลินที่ผลิตจากตับอ่อนทำหน้าที่นำน้ำตาลกลูโคสในกระแสเลือดเข้าสู่เนื้อเยื่อต่างๆ ของร่างกาย เพื่อเผาผลาญเป็นพลังงานในการดำเนินชีวิต ดังนั้นถ้าร่างกายขาดฮอร์โมนอินซูลิน หรือทำงานได้ไม่มีประสิทธิภาพแล้วร่างกายจะไม่สามารถนำน้ำตาลมาใช้ประโยชน์ได้ และจะทำให้น้ำตาลในเลือดสูงจนเป็นโรคเบาหวานในที่สุด การดื่มน้ำส้มสายชูหมักก่อนนอนจะช่วยลดระดับน้ำตาลในขณะที่ร่างกายหลับอยู่เพราะร่างกายได้ผลิตอินซูลินเพิ่มขึ้น น้ำส้มสายชูหมักช่วยขจัดความอ่อนเพลียของร่างกายโดยอาหารที่รับประทานเข้าไปจะถูกย่อย เพื่อเปลี่ยนแป้งเป็นกลูโคส เปลี่ยนโปรตีนเป็นกรดอะมิโน เปลี่ยนไขมันเป็นกลีเซอรอล และกรดไขมัน อาหารต่าง ๆ เหล่านี้ก็จะถูกเผาผลาญและเปลี่ยนไปเป็น ATP (Adenosine triphosphate) ซึ่งให้พลังงานออกมาในรูปความร้อน บางส่วนก็นำไปซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอของร่างกายหากร่างกายเกิดกระบวนการย่อยอาหารได้ไม่สมบูรณ์ หรือทำงานได้ไม่มีประสิทธิภาพจะทำให้เกิดกรดแลคติกสะสมในกล้ามเนื้อทำให้เกิดความเจ็บปวด และเมื่อยล้า หากกรดแลคติกสะสมในกล้ามเนื้อประมาณ 0.24 - 0.40 เปอร์เซ็นต์ ของของเหลวในร่างกายจะทำให้รู้สึกอ่อนเพลีย การตอบสนองของร่างกายจะช้าลง หากปล่อยให้มีการสะสมของกรดแลคติกมากขึ้น จะทำให้เกิดการเกร็งประสาทชา หรืออัมพาตได้ หรืออาจปวดต้นคอหรือไหล่ การหลั่งแอนดีนาลีน (Andrenaline) จากอาการโมโหกังวล เมื่อร่างกายของเราต้องการใช้คลอเลสเตอรอลเป็นพาหะ เคลื่อนย้ายฮอร์โมนบ่อยเกินไปจะทำให้ผนังหลอดเลือดแข็งตัว ซึ่งการดื่มน้ำส้มสายชูหมักเป็นประจำจะทำให้ปริมาณคลอเลสเตอรอลลดลง (Entani et al., 1998) โดยกระบวนการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกรดต่างๆ และเข้าสู่วัฏจักรซิตริก (Citic cycle) จะทำให้ประสิทธิภาพของตับสูงขึ้น น้ำส้มสายชูหมักมีฤทธิ์เป็นกรดช่วยในการดูดซึมแคลเซียม (Ndoye et al., 2007) ผู้สูงอายุจะมีประสิทธิภาพในการดูดซึมแคลเซียมลดลง เนื่องจากน้ำย่อยมีฤทธิ์เป็นกรดมีความจำเป็นต่อแคลเซียมลดลง และตับอ่อนหลั่งโซเดียมไบคาร์บอเนตไปที่ลำไส้เล็กส่วนต้น และตอนบนซึ่งมีฤทธิ์เป็นด่างทำให้แคลเซียมจับตัวกันเป็นโมเลกุลที่ใหญ่ขึ้นทำให้ไม่สามารถแทรกซึมผ่านผนังลำไส้เล็กดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้ น้ำส้มสายชูหมักมีสารที่ช่วยในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อราสามารถช่วยในการรักษาเชื้อราที่เท้าด้วยการแช่เท้าในน้ำส้มสายชูหมักวันละครั้ง จะปรับระดับ pH ของผิวทำให้เชื้อราไม่สามารถเจริญเติบโตได้ และช่วยฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่มีอยู่ได้ด้วย น้ำส้มสายชูหมักช่วยบรรเทาอาการปวดตามน่องขา หรือกล้ามเนื้อ อาการปวดกล้ามเนื้อมักจะเกิดจากระดับโพแทสเซียมในร่างกายต่ำ เมื่อผู้ที่มีอาการปวดกล้ามเนื้อทานน้ำส้มสายชูหมักหนึ่งช้อนชาสามารถช่วยเพิ่มระดับโพแทสเซียมได้อย่างรวดเร็ว และช่วยบรรเทาอาการปวดกล้ามเนื้อได้ น้ำส้มสายชูหมักสามารถช่วยรักษาพิษจากแมงกะพรุน โดยใช้น้ำส้มสายชูหมักแช่ราดลงบริเวณที่ถูกพิษแมงกะพรุนเป็นเวลา 15-30 นาทีเพื่อสลายพิษ โดยน้ำส้มสายชูหมักจะมีฤทธิ์ไปทำลายเซลล์พิษที่มีชื่อ เรียกว่า nematocysts ได้ น้ำส้มสายชูหมักบัลซามิคมีสารแอนติออกซิแดนท์ช่วยซ่อมแซมส่วนที่ถูกทำลายจากอนุมูลอิสระที่สร้างมาจากออกซิเจนในร่างกาย น้ำส้มสายชูหมักบัลซามิคมีองค์ประกอบของโพลีฟีนอลซึ่งสารแอนติออกซิแดนท์นี้สามารถป้องกันโรคหัวใจ และมะเร็งได้ โดยองุ่นที่ใช้ผลิตน้ำส้มสายชูหมักบัลซามิคมีองค์ประกอบของสารแอนติออกซิแดนท์ช่วยปรับปรุงระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย และทำให้เม็ดเลือดมีความยืดหยุ่นมากขึ้นซึ่งช่วยป้องกันปัญหาเกี่ยวกับหัวใจ หรือระบบไหลเวียนเลือด และเสริมภูมิต้านทาน (Armentia et al., 2010)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการผลิตน้ำส้มสายชู

2.2.1 *Acetobacter* spp.

Acetobacter คือ แบคทีเรียในวงศ์ Pseudomonadaceae มีรูปร่างเป็นรูปท่อนตรงหรือโค้งเล็กน้อย พบเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ หรือเรียงกันเป็นเส้นสาย บางสายพันธุ์อาจพบลักษณะเป็นเกลียวยืดยาว บวม รูปกระบอก โค้งหรือเป็นสาย ดังใน**ภาพที่ 2.1** บางสายพันธุ์เคลื่อนที่ได้และเคลื่อนที่ไม่ได้ ไม่สร้างเอนโดสปอร์ (endospore) ย้อมติดสีแกรมลบ (gram negative bacteria) ต้องการออกซิเจนในการเจริญ (aerobic bacteria) อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 25-30 องศาเซลเซียส (ธนขวัญ บุษบัน, 2553) สามารถออกซิไดซ์อะซิเตท และแลคเตทไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ (Gosselé et al., 1984)



ภาพที่ 2.1 *Acetobacter* spp.
ที่มา : https://www.sciencephoto.com/media/79517/

2.3 ใบชาเขียว

2.3.1 ความหมายของใบชาเขียว

ใบชาเขียว (Green tea) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Camellia sinensis* ผลิตโดยนำใบชามาอบไอน้ำหลังจากนั้นจึงนำไปกลิ้งด้วยลูกกลิ้ง ทำให้แห้งอย่างรวดเร็วและชาเขียวเป็นชาที่ไม่ผ่านกระบวนการหมักจึงทำให้ใบชายังคงมีสีเขียว ดังใน**ภาพที่ 2.2** จากกระบวนการผลิตที่ง่ายและน้อยขั้นตอนทำให้ชาเขียวยังคงมีปริมาณสารโพลีฟีนอลมากกว่าใบชาอื่นๆที่ผ่านการหมัก เช่น ชาอู่หลง ชาดำ เป็นต้น สารคาเทชิน (catechin) เป็นสารในกลุ่มโพลีฟีนอลที่มีปริมาณสูงถึง 15-30% ของน้ำหนักชาเขียว มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งเป็นประโยชน์ต่อร่างกาย และยังมีสรรพคุณเป็นยารักษาโรคช่วยลดอัตราเสี่ยงจากการเป็นโรคหัวใจ โรคเส้นเลือดในสมองอุดตัน (สิริพร หลอดเงิน, 2563)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 2.2 ใบชาเขียว

ที่มา : https://www.abstract13.com/product/ใบชาเขียว/

2.3.2 สรรพคุณของใบชาเขียว

สรรพคุณของใบชาเขียวมีสารประกอบโพลิฟีนอลที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ สมบัติการต้านอนุมูลอิสระทำให้โพลิฟีนอลในชามีประโยชน์ต่อสุขภาพที่หลากหลาย เช่น ช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งในอวัยวะต่างๆ (Yuan et al., 2011) ลดความเสี่ยงในการเกิดโรคหัวใจและโรคหลอดเลือด (Deka and Vita, 2011) ช่วยควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดของผู้ป่วยโรคเบาหวาน (Shoji and Nakashima, 2006) และช่วยลดความอ้วน (Rains et al., 2011) เป็นต้น

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Krusong et al. (2007) รายงานว่าในช่วงเริ่มต้นการหมักน้ำส้มสายชูจะทำการปรับความเข้มข้นทั้งหมด (Total concentration; TC) เท่ากับ 8 ซึ่งประกอบด้วยกรดอะซิติก 4.5% และแอลกอฮอล์ 3.5% เมื่อทำการหมักไปจนถึงช่วงเอทิลแอลกอฮอล์เหลือประมาณ 0.5% จึงทำการปรับแอลกอฮอล์ให้กลับมามีความเข้มข้นเท่ากับ 3.5% อีกครั้ง การศึกษาในลักษณะนี้จะทำให้ *A. aceti* WK สามารถใช้เอทิลแอลกอฮอล์ (ซึ่งเป็นวัตถุดิบหลักสำหรับผลิตกรดอะซิติก) ที่มีความเข้มข้นที่สูงขึ้นได้

Krusong et al. (2015) ศึกษาผลกระทบของความเข้มข้นเริ่มต้นสูงของกรดอะซิติกและแอลกอฮอล์ต่ออัตราการเกิดอะซิติฟิเคชันในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบหัวฉีด Venturi รายงานว่า การให้อากาศส่งผลต่อมวลชีวภาพทั้งหมดเป็นผลมาจากการให้ออกซิเจนของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพไม่เพียงแต่มีความสำคัญต่อประสิทธิภาพการอะซิติฟิเคชัน (Acetification) เท่านั้น แต่ยังรวมถึงสายพันธุ์แบคทีเรียกรดอะซิติก ที่ใช้ด้วย โดยมีรายงานว่า *Acetobacter* spp. ค่อยๆพัฒนาความต้านทานต่อกรดอะซิติกที่สูงเพิ่มขึ้นเมื่อปรับให้เข้ากับสภาวะความเป็นกรดอย่างเหมาะสม และแบคทีเรีย *A. aceti* WK สายพันธุ์นี้มีความทนทานต่อกรดสูง ผลลัพธ์นี้บ่งบอกถึงศักยภาพในการปรับตัวของเชื้อ *A. aceti* WK ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพภายใต้สภาวะที่มีการเติมอากาศอย่างเหมาะสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Krusong et al. (2015) ศึกษาอิทธิพลของแคลเซียมคลอไรด์ในการทำให้เป็นกรดที่อุณหภูมิสูง โดยสายพันธุ์ *A. aceti* WK สำหรับน้ำส้มสายชู โดยปกติอัตราการเกิดอะซิติฟิเคชัน (Acetification rate) จะเกิดที่อุณหภูมิ 30±1 องศาเซลเซียส การเติมแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) ที่ 0.15% (w/v) ลดผลเสียของการเพิ่มอุณหภูมิจาก 30±1 องศาเซลเซียสเป็น 36±1 องศาเซลเซียส แคลเซียมคลอไรด์มีผลต่อการทนความร้อนของแบคทีเรียกรดอะซิติก ส่งผลให้ได้รับกรดอะซิติกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เพิ่มปริมาณของฟอสโฟลิพิด กรดไขมัน และเอนไซม์ที่จับกับเยื่อหุ้มเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดปฏิกิริยาอะซิติฟิเคชันของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสและอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส ทำให้แบคทีเรีย *A. aceti* WK ทนต่อความร้อนและกรดที่สูงได้

Pardeep Kaur et al. (2011) รายงานว่าน้ำส้มสายชูจากชาเป็นผลิตภัณฑ์การหมักแบบคู่ของสารสกัดถือได้ว่าเป็นการรวมตัวของคุณสมบัติที่เป็นประโยชน์เฉพาะของชาและน้ำส้มสายชู และสารสกัดจากชาอุดมไปด้วยโปรตีน กรดอะมิโน ลิพิด สารระเหย และสารฟลาโวนอยด์ที่มีประสิทธิภาพทั้งหมด น้ำส้มสายชูช่วยรักษาหรือควบคุมกระดูกหัก ท้องผูก หวัด ไอ รังแค ท้องร่วง อุณหภูมิร่างกายต่ำ ปวดฟัน

Xu Huiling et al. (2022) ศึกษาการประเมินสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและสารต้านอนุมูลอิสระของชาเขียวหมักที่ผลิตด้วยวิธีการหมักแบบหนึ่งขั้นตอนและหมักแบบสองขั้นตอน เพื่อเพิ่มการผลิตกรดอะซิติกและให้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพิ่มเติมกับชาเขียวผ่านการหมักแบบขั้นตอนเดียว ทำให้เกิดกรดอะซิติกในขณะที่การหมักแบบสองขั้นตอน ประกอบด้วยการหมักกรดแลคติกตามด้วยการหมักกรดอะซิติก โดยเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติก ที่คัดเลือกสำหรับการหมักกรดอะซิติกพิจารณาจากการเจริญและลักษณะการผลิตกรดอินทรีย์ ปัจจัยการหมัก ได้แก่ การเสริมด้วยแอลกอฮอล์ คาร์โบไฮเดรต และอุณหภูมิ ผลลัพธ์ที่ได้คือ สภาวะการหมักที่เหมาะสมของการหมักหนึ่งขั้นตอน คือ แอลกอฮอล์ 3% ซูโครส 8% และอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สภาวะการหมักที่เหมาะสมของการหมักสองขั้นตอน คือ แอลกอฮอล์ 3% ซูโครส 4% และอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้ผลลัพธ์ออกมาดีที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบและสารเคมี

3.1.1 วัตถุดิบ

ใบชาเขียวแห้ง ซื้อจากร้านรวินท์พร เบเกอร์มาร์ท บริษัท โยคุ จำกัด 79/26 เฉลิมพระเกียรติ ซ.4 ถ.สุขุมวิท 103 แขวงหนองบอน เขตประเวศ กรุงเทพฯ 10250

หัวเชื้อ *Acetobacter aceti* WK ได้รับจาก FACTORY Classroom (ศ.ดร.วราวุฒิ ครูส่ง) ภาควิชาวิศวกรรมอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

Glucose anhydrous	HIMEDIA, India
Yeast Extract Powder	HIMEDIA, India
Magnesium sulphate ($MgSO_4$)	UNIVAR, New Zealand
di-Ammonium hydrogen phosphate (DAP)	UNIVAR, New Zealand

3.1.3 สารเคมี

Alcohol 95%	กรมสรรพสามิต
Acetic acid 98.85%	Merck KGaA, Germany
Sodium hydroxide (NaOH)	UNIVAR, New Zealand
Phenolpthalein	Loba, India
3,4,5-Trihydroxy benzoic acid (Gallic Acid)	Sisco, India
Folin-Ciocalteau reagent	Loba, India
Sodium carbonate	UNIVAR, New Zealand
2,2-Diphenyl-1-Picirylhydrazyl (DPPH)	Sisco, India
Trolox	Sisco, India
Methanol	Loba, India

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

อีบูลลิโอมิเตอร์ (Ebulliometer)	Dujadin-Sallerro, France
เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Balance)	BSA Series, Sartorius, Germany
เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)	UV-3100PC, VWR, USA
เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)	รุ่น 5804R, Eppendorf, Germany

เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนถาดไมโครเพลท (Microplate Reader)

ออโต้ปิเปต (Autopipette)

ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)

บิวเรตต์ (Burettfe)

หลอดทดลอง (Test tube)

ไมโครเวลเพลท (96-well plate)

เครื่องให้อากาศ

คิวเวทท์ (Cuvette)

ถุงกรองชา 100 ไมครอน

เครื่องเขย่าสาร (Vortex mixer)

กระป๋องอลูมิเนียม (Moisture can)

สายยาง

3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

3.3.1 การเตรียมชาเขียว

ชั่งใบชาเขียวแห้ง 4.5 9 13.5 และ 18 กรัม ใส่ในถุงกรองชาที่มีขนาด 100 ไมครอน แช่ในน้ำเดือดที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส ปริมาณ 1.8 ลิตร เป็นเวลา 5 นาที

3.3.2 การหมักน้ำส้มสายชู

นำขั้นตอนที่ 3.3.1 มาเติมกรดอะซิติกเข้มข้น 98% V/V โดยทำการเจือจางด้วยน้ำ เพื่อปรับความเข้มข้นของกรดอะซิติกเริ่มต้นให้เท่ากับ 45 กรัม/ลิตร และปรับแอลกอฮอล์ด้วย 95% ethanol ให้มีความเข้มข้นของแอลกอฮอล์เริ่มต้นเท่ากับ 35 กรัม/ลิตร ทำให้มีความเข้มข้นรวมเริ่มต้น (Total concentration ; TC) เท่ากับ 80 กรัม/ลิตร (Krusong et al., 2015) การปรับขึ้นอยู่กับการคำนวณโดยใช้สมการ

ไม่ก่อกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$N_1V_1 + N_2V_2 = N_{รวม}V_{รวม}$$

โดยที่ N_1 = ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ (กรัม/ลิตร)

V_1 = ปริมาณแอลกอฮอล์ที่ต้องการ (ลิตร)

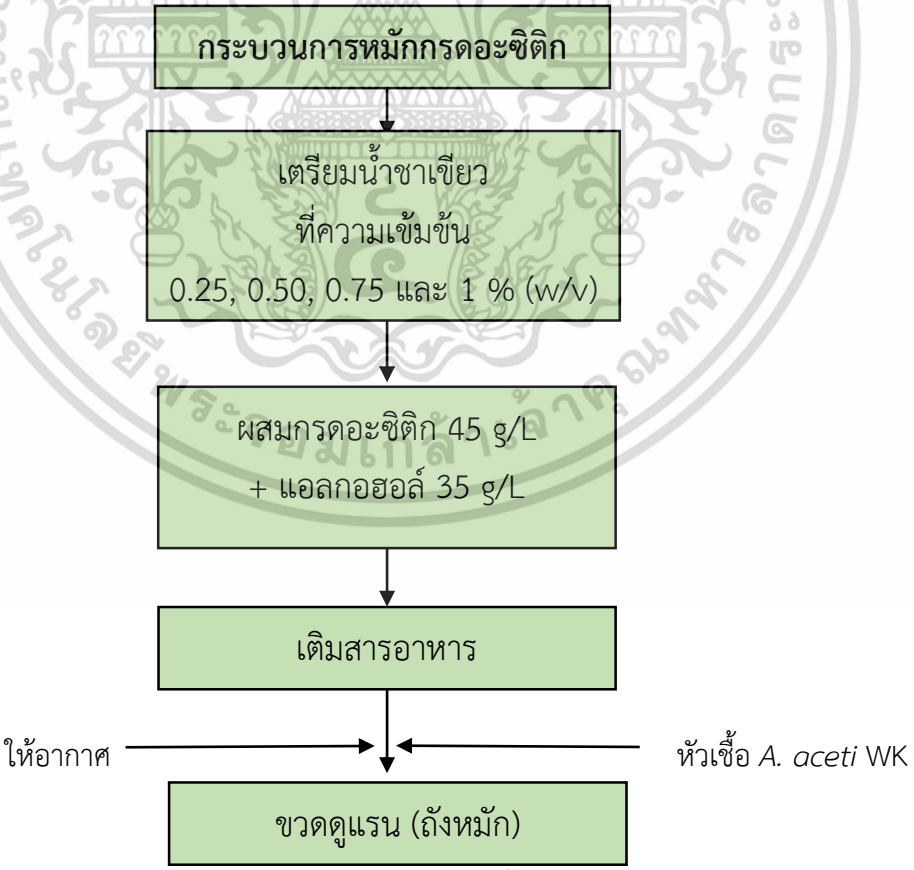
N_2 = ความเข้มข้นของกรดอะซิติก (กรัม/ลิตร)

V_2 = ปริมาตรกรดอะซิติกที่ต้องการ (ลิตร)

$N_{รวม}$ = ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์หรือกรดอะซิติกที่ต้องการเตรียม (กรัม/ลิตร)

$V_{รวม}$ = ปริมาตรของแอลกอฮอล์หรือกรดอะซิติกที่ต้องการเตรียม (ลิตร)

จากนั้นเตรียมลงในขวดดูแรน ปริมาตรการหมัก (Working volume) 2 ลิตร เติมสารอาหาร (ที่มีส่วนประกอบ Glucose 1 กรัม/ลิตร Yeast extract 0.5 กรัม/ลิตร Diammonium phosphate (DAP) 0.5 กรัม/ลิตร และ MgSO. 0.2 กรัม/ลิตร) ลงไป แล้วเติมหัวเชื้อ *A. aceti* WK 10% V/V ของปริมาตรการหมัก เป็นกระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง (Semi-continuous) ทำการหมักน้ำส้มสายชูสามรอบการหมัก และทำการตรวจคุณภาพการหมักของน้ำส้มสายชู โดยตรวจปริมาณแอลกอฮอล์ ปริมาณกรดอะซิติก และน้ำหนักเซลล์แห้ง วันที่ 0 1 3 5 และ 7 ถ้าหากปริมาณแอลกอฮอล์ลดลงเหลือเท่ากับหรือต่ำกว่า 0.5% (Pothimon et al., 2020) แสดงว่าสิ้นสุดการหมัก 1 รอบ ต้องทำการปรับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ และความเข้มข้นของกรดอะซิติกใหม่เพื่อหมักในรอบต่อไป ดังแสดงใน**ภาพที่ 3.1**



ภาพที่ 3.1 กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.3 ตรวจคุณภาพน้ำส้มสายชูระหว่างการหมัก

3.3.3.1 การตรวจปริมาณกรดอะซิติก

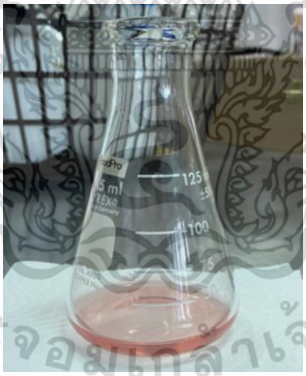
ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 40 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรใน Volumetric flask ขนาด 1 ลิตร จากนั้นทำมาตรฐานสารละลาย NaOH (Standardization of NaOH) เพื่อหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลาย NaOH ด้วย โพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลต หรือ KHP ($KHC_8H_4O_6$) โดยชั่ง KHP 0.5000-0.5200 กรัม และบันทึกน้ำหนักที่ชั่งได้ ละลาย KHP ในน้ำกลั่นปริมาตร 25 มิลลิลิตร หยดฟีนอล์ฟทาลีน 2-3 หยด ไทเทรทสารละลาย KHP กับ NaOH จนถึงจุดยุติ (สีชมพูอ่อน) บันทึกปริมาตรของ NaOH ที่ใช้ไป ทำการคำนวณค่าความเข้มข้นที่แน่นอนของ NaOH (จิรภัทร ขันคลาน และคณะ, 2555) โดยใช้สูตร

$$Normality\ of\ NaOH\ = \frac{g_{KHP}}{204.23\ \times\ V_{NaOH}} \times 100$$

g_{KHP} = น้ำหนักของ KHP เป็นกรัมที่ใช้ในการทดลอง

V_{NaOH} = ปริมาณของ NaOH ที่ใช้ในการไทเทรตสารละลาย KHP

จากนั้นนำ NaOH ที่เตรียมไว้ใส่ในบิวเรต ใช้ออโต้ปิเปตดูดตัวอย่างน้ำส้มสายชูจากใบชามา 6 มิลลิลิตร ใส่ในฟลาสก์หยด Phenolphthalein indicator 2-3 หยด (Fregapane et al., 2001) ลงในฟลาสก์ และทำการไทเทรตเพื่อหาจุดยุติ (สีชมพูอ่อน) ดังแสดงใน**ภาพที่ 3.2** ทำการจดบันทึก



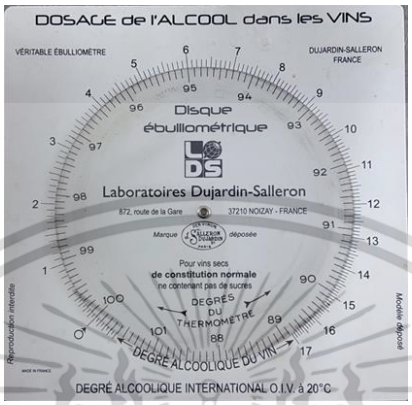
ภาพที่ 3.2 จุดยุติในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดในตัวอย่าง
ที่มา : ไพลิน ศรีโยหะ (2566)

3.3.3.2 การวัดปริมาณแอลกอฮอล์ด้วยเครื่องอีบูลลิโอมิเตอร์

ก่อนทำการตรวจตัวอย่างจะต้องหาจุดเดือดของน้ำก่อน โดยใส่น้ำกลั่นลงในหม้อต้มของเครื่อง (ใช้หลอดแก้วที่มากับตัวเครื่อง ตวงน้ำระดับเส้นล่างสุดของหลอด - EAU) ใส่คอนเดนเซอร์และเทอร์โมมิเตอร์เพื่อวัดอุณหภูมิในตำแหน่งที่กำหนด จุดตะเกียงแอลกอฮอล์เพื่อหาจุดเดือดของน้ำ เมื่ออุณหภูมินิ่งแล้วให้อ่านค่าอุณหภูมิ บันทึกจุดเดือดของน้ำ นำไปตั้งค่าบนแผ่นอ่านค่ามาตรฐานที่ใช้สำหรับเทียบหาเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ ปล่อยน้ำกลั่นทิ้ง และนำตัวอย่างใส่ลงในหม้อต้มของเครื่อง (ใช้หลอดแก้วที่มากับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวเครื่อง ตวงตัวอย่างในระดับขีดบนสุด -VIN) เติมน้ำหล่อเย็นลงในคอนเดนเซอร์ ติดเทอร์โมมิเตอร์ในตำแหน่งที่กำหนดแล้วจุดตะเกียงแอลกอฮอล์ เมื่ออุณหภูมิหยุดนิ่งให้อ่านค่าอุณหภูมิที่ได้ นำมาเทียบบนแผ่นอ่านค่ามาตรฐาน โดยกำหนดให้ตำแหน่งจุดเดือด ของน้ำมีค่าตรงกับดีกรีแอลกอฮอล์ที่เป็น 0% หรือ 0 ดีกรีอ่านค่าแอลกอฮอล์ที่ได้ (เจนจิรา ชุมภูคำ และคณะ, 2557) ดังแสดงใน**ภาพที่ 3.3**



ภาพที่ 3.3 แผ่นอ่านค่ามาตรฐานที่ใช้สำหรับเทียบหาเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์
ที่มา : ไพลิน ศรีโยหะ (2565)

3.3.3.3 น้ำหนักเซลล์แห้ง (Cell dry weight)

นำตัวอย่างน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียวที่มีเซลล์ *A. aceti* WK ปริมาณ 50 มิลลิลิตร มาใส่ในหลอดหมุนเหวี่ยงแล้วทำการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จะเกิดการแยกตะกอนกับส่วนใสขึ้น เทส่วนใสออกแล้วทำการล้างด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง จากนั้นนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในหลอดทดลอง อัตราส่วนเจือจาง 100:0 80:20 60:40 40:60 และ 20:80 นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเอาเฉพาะเซลล์มาทำการทดลองปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำไปชั่งน้ำหนัก ส่วนที่เหลือนำไปวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร นำทั้งสองค่ามาหาความสัมพันธ์ โดยทำการพลอตกราฟมาตรฐานระหว่างค่าความขุ่นที่อ่านได้กับน้ำหนักแห้งของเซลล์ จะได้สมการเส้นตรงเพื่อใช้ในการคำนวณค่าน้ำหนักแห้งของเซลล์ (Krusong and Vichitraka, 2011)

สูตรคำนวณหาปริมาณน้ำหนักแห้งของเซลล์

$$\text{คำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม)} = \frac{(B - A) \times 1{,}000}{\text{ปริมาตรของตัวอย่าง}}$$

โดย A คือ น้ำหนักอะลูมิเนียมแคนที่ผ่านการอบ
B คือ น้ำหนักตัวอย่างที่อยู่ในอะลูมิเนียมแคนที่ผ่านการอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.4 การวิเคราะห์

8.4.4.1 วิเคราะห์ปริมาณโพลีฟีนอล

ปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดของน้ำส้มสายชู (Brimson et al., 2012) วิเคราะห์ โดยนำตัวอย่างมา 50 ไมโครลิตร แล้วเติม Folin-ciocalteu's phenol reagent 50 ไมโครลิตร ลงใน 96 well plate พักไว้ 20 นาที ในที่มืด หลังจากนั้นเติมโซเดียมคาร์บอเนตที่ความเข้มข้น 35 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร ด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ ใช้กรดแกลลิกเป็นมาตรฐานสำหรับกราฟการเปรียบเทียบ

8.4.4.2 วิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ

การวิเคราะห์ DPPH (Yam et al., 2008) เป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน (Antioxidant) ที่สะดวก รวดเร็วง่ายต่อการวิเคราะห์ ให้ความถูกต้องและแม่นยำสูง โดยเตรียมสารละลาย DPPH ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ละลายในเมทานอลที่ 100 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตตัวอย่างน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียว 100 ไมโครลิตร และปิเปตสารละลาย DPPH ที่เตรียมไว้ข้างต้นปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงใน 96 well plate จากนั้นบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงถูกวัดที่ 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ ใช้โทรลอกซ์เป็นสารละลายมาตรฐาน

คำนวณหาผลลัพธ์โดยใช้สูตรต่อไปนี้

$$\%Inhibition = \frac{(A_{517control} - A_{517\ sample})}{A_{517control}} \times 100$$

โดยที่ $A_{517control}$ = การดูดกลืนของตัวควบคุม

$A_{517sample}$ = การดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ศึกษาประสิทธิภาพการผลิตกรดอะซิติกในน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียว

ในการศึกษาการปรับสภาพของหัวเชื้อ *Acetobacter aceti* WK ในการหมักน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียวที่ความเข้มข้นของใบชาแตกต่างกัน คือ 0.25 0.50 0.75 และ 1% (w/v) ความเข้มข้นทั้งหมด (Total concentration; TC) เท่ากับ 80 กรัม/ลิตร ซึ่งประกอบด้วยกรดอะซิติก 45 กรัม/ลิตร แอลกอฮอล์ 35 กรัม/ลิตร โดยทำการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องในขวดดูแรนขนาด 2 ลิตร ปริมาตรการหมัก 1.8 ลิตร ทำการหมักทั้งหมดสามรอบการหมักในสภาพที่มีอากาศ ซึ่งกระบวนการหมักน้ำส้มสายชูจะอาศัยเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม Acetic acid bacteria เปลี่ยนแอลกอฮอล์ให้เป็นกรดอะซิติก ในช่วงแรกเป็นช่วง Start-up phase เชื้อมีการใช้แอลกอฮอล์เพื่อผลิตกรดอะซิติกออกมาได้ในปริมาณที่น้อย และเจริญช้า แต่เมื่อหมักไปจนถึงช่วงที่เชื้อปรับตัวได้ดีมากยิ่งขึ้น เชื้อจะสามารถนำแอลกอฮอล์ไปใช้และสร้างกรดอะซิติกออกมาได้ในปริมาณที่เหมาะสม จากการทดลองศึกษาการปรับสภาพของหัวเชื้อในการหมักน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียวที่ความเข้มข้นของใบชาแตกต่างกัน คือ 0.25 0.50 0.75 และ 1% (w/v) ในการหมักทั้งหมดสามรอบการหมัก โดยแต่ละรอบของการผลิตจะใช้ระยะเวลาการหมักที่แตกต่างกัน ซึ่งจะสังเกตปริมาณของแอลกอฮอล์ที่ต่ำกว่า 0.5% คือปริมาณสิ้นสุดของการหมักหนึ่งรอบการหมัก และจะเริ่มเปลี่ยนรอบการหมักน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียวที่มีความเข้มข้นของใบชาเขียวที่แตกต่างกัน ดังแสดงใน**ตารางที่ 4.1** ที่แสดงอัตราเฉลี่ยของปริมาณกรดอะซิติกของน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียวแต่ละความเข้มข้น

ตารางที่ 4.1 อัตราเฉลี่ยการสร้างกรดของน้ำส้มสายชูด้วยเชื้อ *A. aceti* WKจากใบชาเขียวที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

ความเข้มข้นของใบชาเขียว (% w/v)	Acetification period (day)	Acid produce (g/L)	Acetification rate (g/L/d)
0.25	15.3	10.589 ± 0.823^{b}	0.078 ± 0.006^{b}
0.5	14	11.133 ± 0.333^{b}	0.082 ± 0.010^{b}
0.75	14.3	14.300 ± 1.021^{a}	0.106 ± 0.015^{a}
1	14	11.467 ± 0.667^{b}	0.085 ± 0.012^{b}

หมายเหตุ; อักษรที่เหมือนกันตามแนวตั้งแสดงความไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อเทียบใน DMRT

จาก**ตารางที่ 4.1** แสดงอัตราเฉลี่ยการสร้างกรดของหัวเชื้อ *A. aceti* WK ในการหมักน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียวที่ความเข้มข้นของใบชาแตกต่างกันพบว่า น้ำส้มสายชูจากใบชาเขียว 0.25 0.50 และ 1% (w/v) สามารถผลิตกรดอะซิติกเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเท่ากับ 10.589 ± 0.823 11.133 ± 0.333 และ 11.467 ± 0.667 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ต่างจากความเข้มข้น 0.75% (w/v) สามารถผลิตกรด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อะซิติกเฉลี่ยเท่ากับ 14.300 ± 1.021 กรัม/ลิตร อัตราการผลิตกรดเฉลี่ย (Acetification rate) พบว่าน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียว 0.25 0.50 และ 1% (w/v) มีอัตราการผลิตกรดเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเท่ากับ 0.078 ± 0.006 0.082 ± 0.01 และ 0.085 ± 0.012 กรัม/ลิตร/วัน ตามลำดับ ต่างจากความเข้มข้น 0.75% (w/v) ที่มีอัตราการผลิตกรดเฉลี่ยเท่ากับ 0.106 ± 0.015 กรัม/ลิตร/วัน ซึ่งระยะเวลาที่ใช้หมักน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียวที่ความเข้มข้น 0.25 0.50 0.75 และ 1% (w/v) เฉลี่ยอยู่ที่ 15.3 14 14.3 และ 14 วัน ตามลำดับ

4.2 การศึกษาการเจริญของเชื้อ *A. aceti* WK ในน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียว

ในการศึกษาปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (Cell dry weight; CDW) ของเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติก *A. aceti* WK ในการหมักน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียวที่ความเข้มข้นแตกต่างกันคือ 0.25 0.50 0.75 และ 1% (w/v) สภาวะการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง ในขวดดูเรนขนาด 2 ลิตร ปริมาตรการหมัก 1.8 ลิตร ทำการหมักทั้งหมดสามรอบการหมัก โดยเก็บตัวอย่างก่อนการหมัก ระหว่างการหมัก และหลังการหมักเสร็จสิ้น เพื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกในแต่ละรอบการหมัก ซึ่งวิธีนี้เป็นการรวมกันของเซลล์แบคทีเรียอะซิติกที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต อย่างไรก็ตามปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (CDW) มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับการผลิตกรดอะซิติก (Krusong et al., 2015) แสดงผลการทดลองดัง**ตารางที่ 4.2**

ตารางที่ 4.2 ค่าปริมาณการผลิตเซลล์ อัตราการผลิตเซลล์ และอัตราการผลิตกรดอะซิติกของเชื้อ *A. aceti* WK ในการหมักน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียวที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของใบชาเขียว (% w/v)	การผลิตเซลล์ (mg/L)	อัตราการผลิตเซลล์ (mg/L/d)	อัตราการผลิตกรดอะซิติก (mg/L/d)
0.25	370.304 ± 175.444[a]	26.250 ± 8.310[a]	76.667 ± 5.774[b]
0.50	367.846 ± 229.859[a]	25.8 ± 12.108[a]	83.333 ± 11.547[b]
0.75	382.074 ± 142.904[a]	27.367 ± 6.496[a]	103.333 ± 15.275[a]
1	381.339 ± 181.874[a]	27.153 ± 8.925[a]	85 ± 11.358[b]

หมายเหตุ; อักษรที่เหมือนกันตามแนวตั้งแสดงความไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อเทียบใน DMRT

จาก**ตารางที่ 4.2** การศึกษาปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อ *A. aceti* WK ในการหมักน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียวที่ความเข้มข้นแตกต่างกันพบว่า น้ำส้มสายชูจากใบชาเขียวความเข้มข้น 0.25 0.50 0.75 และ 1% (w/v) เมื่อหมักครบทั้งหมดสามรอบการหมักสังเกตเห็นว่า ปริมาณการผลิตเซลล์เฉลี่ยของน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียวทั้งสี่ความเข้มข้นเมื่อหมักครบสามรอบการหมัก ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญซึ่งมีปริมาณเซลล์อิสระในน้ำหมักเท่ากับ 370.304±175.444 367.846±229.859 382.074±142.904 และ 381.339±181.874 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ เมื่อคำนวณอัตราการผลิตเซลล์แบคทีเรียอะซิติกเฉลี่ยของน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียวที่ความเข้มข้น 0.25 0.50 0.75 และ 1% (w/v) พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเท่ากับ 26.250±8.310 25.8±12.108 27.367±6.496 และ 27.153±8.925 มิลลิกรัม/ลิตร/วัน ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด และสารต้านอนุมูลอิสระของน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียว

ในธรรมชาติสารประกอบฟีนอลิกเป็นสารที่พบได้ในพืช และมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (เนตรนภา เมยกลาง และคณะ, 2014) ดังนั้นชาเขียวจึงมีสรรพคุณเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูง เมื่อนำใบชาเขียวมาหมักน้ำส้มสายชูโดยแบคทีเรียกรดอะซิติก *A. aceti* WK ทำการหมักน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียวที่ความเข้มข้นแตกต่างกันคือ 0.25 0.50 0.75 และ 1% (w/v) สภาวะการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องในขวดดูแรนขนาด 2 ลิตร ปริมาตรการหมัก 1.8 ลิตร ทำการหมักทั้งหมดสามรอบการหมัก โดยเก็บตัวอย่างก่อนการหมักและหลังการหมักเสร็จสิ้น เพื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดและวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระในแต่ละรอบการหมัก การวิเคราะห์หาปริมาณสารโพลีฟีนอลทั้งหมดจะใช้ วิธี Folin-Ciocalteu ซึ่งสารละลายโฟลินมีสีเหลือง เมื่อเกิดปฏิกิริยาสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีน้ำเงิน นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระจะใช้วิธีการทดสอบ DPPH ซึ่งเป็นวิธีการวิเคราะห์ที่รวดเร็ว และใช้รีเอเจนต์ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl สารละลายจะมีสีม่วงเมื่อทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในตัวอย่างน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียว สีของสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ถ้าตัวอย่างมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้สูง ความเข้มของสารละลายสีม่วงจะลดลง การรายงานผลการทดลองจะรายงานเป็นค่า IC_{50} (50% Inhibitory Concentration) แสดงความเข้มข้นของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งได้ 50% ผลดังแสดงใน**ตารางที่ 4.3** แสดงถึงปริมาณปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด และสารต้านอนุมูลอิสระของน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียว

ตารางที่ 4.3 การวิเคราะห์ปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด และสารต้านอนุมูลอิสระในน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียว

Experiment	ความเข้มข้นของใบชาเขียว (%w/v)			
	0.25	0.50	0.75	1
Control	$116.742 \pm 3.393^{D,a}$	$245.934 \pm 1.393^{C,a}$	$280.465 \pm 1.129^{B,a}$	$401.086 \pm 2.678^{A,a}$
Total polyphenol (mg/mL)	$103.167 \pm 5.661^{D,b}$	$200.550 \pm 12.936^{C,b}$	$267.844 \pm 9.386^{B,b}$	$363.72 \pm 7.789^{A,b}$
Control	$3.533 \pm 0.206^{B,a}$	$1.410 \pm 0.023^{A,a}$	$1.262 \pm 0.002^{A,a}$	$1.168 \pm 0.032^{A,a}$
IC_{50} DPPH activity (mg/mL)	$3.786 \pm 0.229^{C,a}$	$1.961 \pm 0.039^{B,b}$	$1.529 \pm 0.029^{A,a}$	$1.341 \pm 0.091^{A,b}$

หมายเหตุ: ค่าที่แสดงในตารางที่ได้จากการหมักน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียว ที่ความเข้มข้นทั้งหมด (Total concentration; TC) เท่ากับ 8%ค่าเฉลี่ยของสารประกอบโพลิฟีนอลในแถวแนวนอนเดียวกันที่ตามด้วยอักษรตัวพิมพ์ใหญ่ (A-D) ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) และค่าเฉลี่ยของสารประกอบโพลิฟีนอลในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรตัวพิมพ์เล็ก (a-c) ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อเทียบใน DMRT

จากการศึกษาการวิเคราะห์สารประกอบโพลิฟีนอลทั้งหมดและสารต้านอนุมูลอิสระในน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียวความเข้มข้น 0.25 0.50 0.75 และ 1% (w/v) ที่ผ่านกระบวนการหมักเพื่อให้ได้กรดอะซิติกโดยเชื้อ *A. aceti* WK จากผลการทดลองแสดงค่าปริมาณโพลิฟีนอลทั้งหมดของน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียวความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เข้มข้นต่างๆ ก่อนการหมักและหลังจากสิ้นสุดการหมัก แสดงให้เห็นว่า Control ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของใบชาเขียว 0.25 0.50 0.75 และ 1% (w/v) พบว่าปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเท่ากับ 116.742±3.393 245.934±1.393 280.465±1.129 และ401.086±2.678 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อทำการหมักต่อไปและเก็บตัวอย่างน้ำส้มสายชูสิ้นสุดการหมักมาวิเคราะห์ พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเท่ากับ 103.167±5.661 200.55±12.936 267.844±9.386 และ 363.72±7.789 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ มีความสัมพันธ์กับการวิเคราะห์หาสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH จากผลการทดลองแสดงค่า IC_{50} ของ Control ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของใบชาเขียว 0.25 0.50 0.75 และ 1% (w/v) พบว่าความเข้มข้น 0.50 0.75 และ 1% (w/v) มีค่า IC_{50} ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเท่ากับ 1.410±0.023 1.262±0.002 และ 1.168±0.032 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ต่างจากความเข้มข้น 0.25% (w/v) มีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.533 ± 0.206 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เมื่อทำการหมักต่อไปจนครบสามรอบการหมัก และเก็บตัวอย่างน้ำส้มสายชูมาวิเคราะห์ เห็นได้ว่าตัวอย่างน้ำส้มสายชูความเข้มข้น 0.75 และ 1% (w/v) ค่า IC_{50} ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเท่ากับ 1.529±0.029 และ1.341±0.091 ตามลำดับ ต่างจากความเข้มข้น 0.25 และ 0.50% (w/v) ที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.786±0.229 และ 1.961±0.039 ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เมื่อนำใบชาเขียวมาผ่านกระบวนการหมักกรดอะซิติกเพื่อให้ได้น้ำส้มสายชูจากใบชาเขียว ส่งผลทำให้สารประกอบโพลิฟีนอลทั้งหมดที่มีอยู่ในใบชาเขียวซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารอนุมูลอิสระลดต่ำลง เมื่อเทียบกับปริมาณสารประกอบโพลิฟีนอลทั้งหมดของน้ำชาเขียวก่อนการหมักกรดอะซิติก

4.4 วิจารณ์ผลการทดลอง

การหมักน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียวโดยเชื้อกลุ่ม Acetic acid bacteria จำเป็นต้องหมักในสภาพที่มีอากาศ เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกต้องการอากาศในการเปลี่ยนแอลกอฮอล์ให้เป็นกรดอะซิติกในระหว่างการหมักให้ได้น้ำส้มสายชู สังเกตเห็นได้ว่า การให้อากาศในน้ำหมักจะใช้เครื่องปั๊มสำหรับให้อากาศ และการควบคุมอัตราการให้อากาศของการหมักน้ำส้มสายชูมีอัตราการให้อากาศที่ไม่เท่ากันเพราะเครื่องปั๊มอากาศต่างกันจึงมีแรงดันอากาศที่ไม่เท่ากัน ตัวเครื่องไม่สามารถแสดงระดับการให้อากาศ จึงอาจส่งผลให้ระยะเวลาในการหมักน้ำส้มสายชูทั้งสี่ความเข้มข้นไม่เท่ากัน ผลที่ได้จากการหมักอาจมีค่าไม่เสถียรเท่าที่ควร หากการหมักน้ำส้มสายชูใบชาเขียวสามารถกำหนดระดับแรงดันของอากาศได้ มีอัตราการให้อากาศเท่ากันและคงที่ในทุกตัวอย่าง จะสามารถทำให้การหมักน้ำส้มสายชูมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น มีความเสถียร และผลถูกต้องแม่นยำมากยิ่งขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาการหมักน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียวที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน (0.25 0.50 0.75 และ 1% w/v) โดยเชื้อ *A. aceti* WK ภายใต้ความเข้มข้นรวม (Total concentration; TC) เท่ากับ 80 กรัม/ลิตร ในขวดดูแรนขนาด 2 ลิตร ปริมาตรการหมัก 1.8 ลิตร ทำการหมักทั้งหมดสามรอบการหมัก จากนั้นเก็บตัวอย่างก่อนเริ่มต้นการหมัก ระหว่างการหมัก และหลังจากสิ้นสุดการหมักมาวิเคราะห์ สรุปผลได้ว่า น้ำส้มสายชูจากใบชาเขียวความเข้มข้น 0.75% (w/v) มีอัตราการผลิตกรดอะซิติกมากที่สุดเท่ากับ 0.106±0.015 กรัม/ลิตร/วัน การวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งพบว่า น้ำส้มสายชูจากใบชาเขียวที่ความเข้มข้น 0.75% (w/v) มีการผลิตเซลล์มากที่สุดเท่ากับ 382.074±142.904 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับความเข้มข้นอื่น และน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียวที่มีการผลิตเซลล์น้อยที่สุดคือ ความเข้มข้น 0.50% (w/v) เท่ากับ 367.846±229.859 มิลลิกรัม/ลิตร ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับอัตราการผลิตกรดอะซิติกที่สูง (Krusong et al., 2015) เมื่อนำตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดพบว่า ตัวอย่างน้ำส้มสายชูหลังจากหมักครบสามรอบการหมักที่มีปริมาณโพลีฟีนอลมากที่สุดคือ น้ำส้มสายชูใบชาเขียวความเข้มข้น 1% (w/v) โดยก่อนการหมักมีปริมาณเท่ากับ 401.086±2.678 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และหลังจากหมักครบสามรอบการหมักมีปริมาณเท่ากับ 363.72±7.789 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ส่วนน้ำส้มสายชูใบชาเขียวที่มีปริมาณโพลีฟีนอลน้อยที่สุดคือ น้ำส้มสายชูใบชาเขียวความเข้มข้น 0.25% (w/v) โดยก่อนการหมักมีปริมาณเท่ากับ 116.742±3.393 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร หลังจากหมักครบสามรอบการหมักมีปริมาณเท่ากับ 103.167±5.661 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งสอดคล้องกับการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระที่รายงานเป็นค่า IC_{50} เมื่อนำตัวอย่างมาวิเคราะห์หาสารต้านอนุมูลอิสระพบว่า น้ำส้มสายชูจากใบชาเขียวความเข้มข้น 1% (w/v) ก่อนการหมักมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.168±0.032 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร หลังจากหมักครบสามรอบการหมักมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.341±0.091 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตัวอย่างน้ำส้มสายชูใบชาเขียวที่มีค่า IC_{50} มากที่สุดคือ น้ำส้มสายชูใบชาเขียวความเข้มข้น 0.25% (w/v) ก่อนการหมักมีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.533±0.206 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และหลังจากหมักครบสามรอบการหมักมีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.786±0.229 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ทั้งนี้ปริมาณใบชาเขียวที่ชั่งในแต่ละความเข้มข้นทำให้มีปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดมีค่าแตกต่างกัน เมื่อนำไปใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับหมักเป็นน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียว โดยเชื้อแบคทีเรียอะซิติก และมีการผลิตกรดออกมาทำให้ส่งผลโดยตรงกับสารประกอบโพลีฟีนอลที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยกรดอะซิติกที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักจะไปทำลายโครงสร้างของสารต้านอนุมูลอิสระทำให้เสียสภาพไป (Su and Chien, 2007)

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากการทดลองพบว่า ควรควบคุมอัตราการให้อากาศของน้ำส้มสายชูจากใบชาแต่ละความเข้มข้นให้เท่ากัน เพื่อให้ประสิทธิภาพของการหมัก และอัตราการระเหยออกของแอลกอฮอล์มีความเสถียร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

จิรภัทร ขันคลาย สกุณณี บวรสมบัติ และสิทธิสิน บวรสมบัติ. 2555. การผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากน้ำเวย์เต้าหู้. วิทยานิพนธ์. วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

เจนจิรา ชุมภูคำ วีระพงษ์ ทรัพย์นำ และทัศไนย จารุวัฒนพันธ์. 2557. ผลของอัตราส่วนประกอบต่อคุณภาพของไวน์เปลือกกาแฟและความพึงพอใจของผู้บริโภค. วารสารแก่นเกษตร. 42: 415-420

ธนขวัญ บุษบัน. 2553. ความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียกรดน้ำส้มที่พบในอาหารหมักดองในเขตดุสิต กรุงเทพมหานคร. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. สาขาวิชาจุลชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา.

เนตรนภา เมยกลาง. 2557. การหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในเครื่องดื่มน้ำผลไม้. วารสารมหาวิทยาลัยขอนแก่น. 3: 69-79.

ใบชาเขียว. 2019. https://www.abstract13.com /product/ใบชาเขียว/.

พรพรรณ พัวไพบูลย์. 2560. การพัฒนาผลิตภัณฑ์น้ำส้มสายชูหมักเพิ่มสารแกมมาอะมิโนบิวทิริกแอซิด(กาบา)จากข้าวกล้องงอกอินทรีย์. วิทยานิพนธ์ปริญญาดุษฎีบัณฑิต. สาขาวิชาเทคโนโลยีการอาหาร. คณะเทคโนโลยีการเกษตร. มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม.

สิริพร หลอดเงิน. 2563. ชาเขียวเครื่องดื่มยอดฮิต. วารสารสุทธิปริทัศน์. 16: 28-36.

Arnold, S., Becker, T., Delgado, A.,, Emde, F., and Enenkel, A. 2002. Optimizing high strength acetic acid bioprocess by cognitive methods in an unsteady state cultivation. *Journal of Biotechnology*. 97: 133-145.

Armentia, A., Dueñas-Laita, A., Pineda, F., Herrero, M., and Martín, B. 2010. Vinegar decreases allergenic response in lentil and egg food allergy. *Allergologia et Immunopathologia.* 38: 74-77.

Acetobacter spp. 2023. https://www.sciencephoto.com/media/79517/

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Brimson, J. M., Brimson, S. J., Brimson, C. A., Rakkhitawatthana, V., and Tencomnao, T. 2012. Rhinacanthus nasutus extracts prevent glutamate and amyloid-β neurotoxicity in HT-22 mouse hippocampal cells: possible active compounds include lupeol, stigmasterol and β-sitosterol. *International Journal of Molecular Sciences.* 13: 5074-5097.

Chen, C., Liang, N., C. M., Lai, J. R., Tsai, Y. J., Tsay, J. S. and Lin, J. K. 2003. Capillary electrophoretic determination of theanine, caffeine, and catechins in fresh tea leaves and oolong tea and their effects on ratneurosphere adhesion and migration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 51: 7495–7503.

de Ory, I.D., Romero, L.E., and Cantero, D. 2002. Optimum starting-up protocol of a pilot plant scale acetifier for vinegar production. *Journal of Food Engineering*. 52: 31-37.

de Ory, I.D., Romero, L.E., and Cantero, D. 2004. Optimization of immobilization conditions for vinegar production. Siran, wood chips and polyurethane foam as carriers for *Acetobacter aceti*. *Process Biochemistry*. 39: 547-555.

Deka, A., and Vita, J. A. 2011. Tea and cardiovascular disease. *Pharmacological research.* 64: 136-145.

Entani, E., Asai, M., Tsujihata, S., Tsukamoto, Y., and Ohta, M. 1998. Antibacterial action of vinegar against food-borne pathogenic bacteria including Escherichia coli O157: H7. *Journal of Food Protection*. 61: 953-959.

Fregapane, G., Rubio-Fernandez, H., and Salvador, M.D. 2003. Continuous production of wine vinegar in bubble column reactor of up to 60-litre capacity. *European Food Research Technology*. 216: 63-67

Fregapane, G., Rubio-Fernandez, H., and Salvador, M.D. 2001 Influence of fermentation temperature on semi- continuous acetification for wine vinegar production. *European Food Research and Technology.* 213: 62–66.

Gosselé, F., Swings, J., Mossel, D. A. A., and De Ley, J. 1984. Identification of *Acetobacter strains* isolated from spoiled lactic acid fermented meat food for pets. *Antonie van Leeuwenhoek*. 50:269-274.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Horiuchi, J. I., Kanno, T., and Kobayashi, M. 1999. New vinegar production from onions. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 88: 107-109.

Kondo, S., Tayama, K., Tsukamoto, Y., Ikeda, K., and Yamori, Y. 2001. Antihypertensive effects of acetic acid and vinegar on spontaneously hypertensive rats. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 65: 2690-2694.

Krusong, W., Vichitraka, A., and Pornpakdeewattana, S. 2007. Luffa Sponge as supporting material of *Acetobacter aceti* WK for corn vinegar production in semi – continuous process. *KMITL Science Journal*. 7: 63-68.

Krusong, W., and Vichitraka, A. 2011. An air-lift acetifier with mash recycling system for corn vinegar production by adsorbed cells of *Acetobacter aceti* WK on surface of loofa sponge. *In 2nd International Conference on Biotechnology and Food Science IPCBEE*. 7: 86-90.

Krusong, W., Yaiyen, S., and Pornpukdeewatana, S. 2015. Impact of high initial concentrations of acetic acid and ethanol on acetification rate in an internal Venturi injector bioreactor. *Journal of Applied Microbiology*. 118: 629-640.

Krusong, W., Kerdpiboon, S., Jindaprasert, A., Yaiyen, S., Pornpukdeewatana, S., and Tantratian, S. 2015. Influence of calcium chloride in the high temperature acetification by strain *Acetobacter aceti* WK for vinegar. *Journal of Applied Microbiology*. 119: 1291-1300.

Kaur, P., Kocher, G. S., and Phutela, R. P. 2011. Production of tea vinegar by batch and semicontinuous fermentation. *Journal of Food Science and Technology*. 48: 755-758.

Ndoye, B., Weekers, F., Diawara, B., Guiro, A. T., and Thonart, P. 2007. Survival and preservation after freeze-drying process of thermoresistant acetic acid bacteria isolated from tropical products of Subsaharan Africa. *Journal of Food Engineering.* 79: 1374-1382.

Pothimon, R., Gullo, M., La China, S., Thompson, A. K., and Krusong, W. 2020. Conducting High acetic acid and temperature acetification processes by *Acetobacter pasteurianus* UMCC 2951. *Process Biochemistry*. 98: 41-50.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Rosidah, Yam, M., Sadikun, A., and Asmawi, M. 2008. Antioxidant potential of Gynura procumbens. *Pharmaceutical Biology*. 46: 616-625.

Rains, T. M., Agarwal, S., and Maki, K. C. 2011. Antiobesity effects of green tea catechins: a mechanistic. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 22: 1-7.

Shoji, Y., and Nakashima, H. 2006. Glucose-lowering effect of powder formulation of African black tea extract in KK-A(y)/TaJcl diabetic mouse. *Archives of Pharmacal Research*. 29: 786-794.

Su, M.S., and Chien, P.J. 2007. Antioxidant activity, anthocyanins, and phenolics of rabbiteye blueberry (Vaccinium ashei) fluid products as affected by fermentation. *Food Chemistry*. 104: 182-187.

Xu, H., Hong, J. H., Kim, D., Jin, Y. H., Pawluk, A. M., and Mah, J. H. 2022. Evaluation of bioactive compounds and antioxidative activity of fermented green tea produced via one-and two-Step fermentation. *Antioxidants*. 11: 1425.

Yuan, J.-M., Sun, C., and Butler, L.M. 2011. Tea and cancer prevention: Epidemiological studies. *Pharmacological Research*. 64: 123-135.

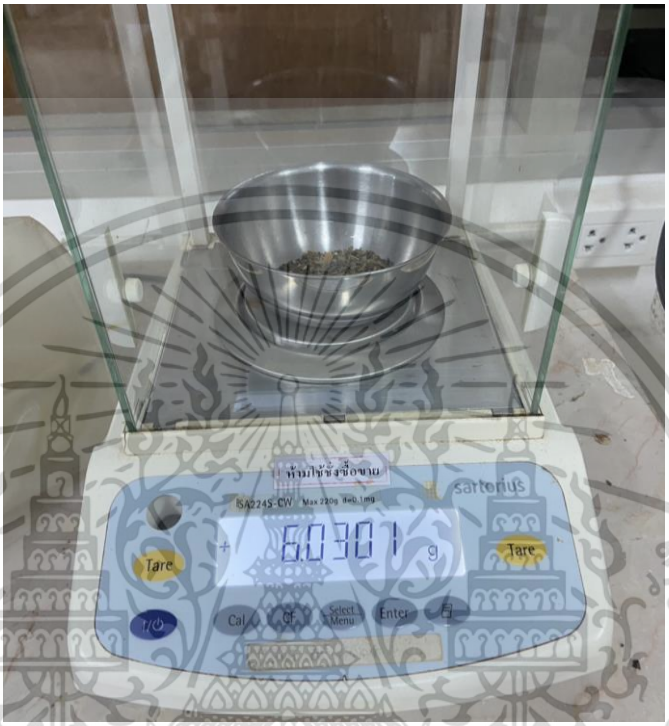
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

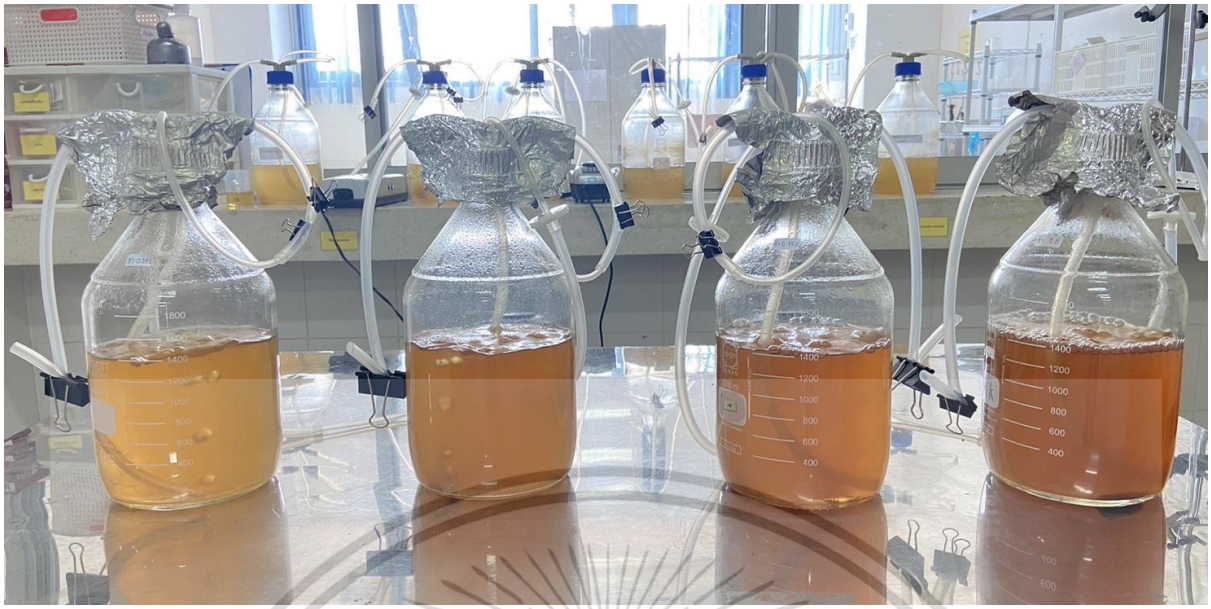
รูปภาพ



ภาพที่ ก.1 ขั้นตอนการเตรียมชาเขียว โดยชั่งด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

ภาพที่ ก.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ Glucose anhydrous Yeast Extract Powder Magnesium sulphate 7-hydrate และdi-Ammonium hydrogen phosphate (DAP)

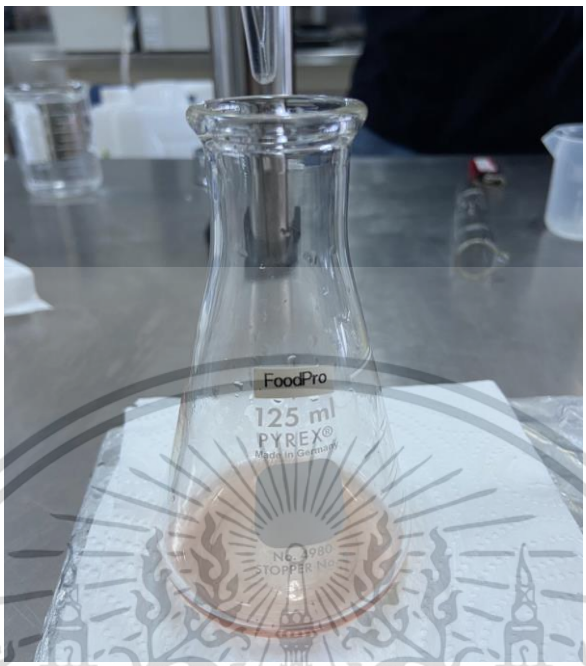
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ ก.3 การหมักน้ำส้มสายชูด้วยเชื้อ *A. aceti* WK ในขวดดูแรนที่อุณหภูมิห้อง 30 องศาเซลเซียส

ภาพที่ ก.4 ไทเทรตหาปริมาณกรดในตัวอย่างน้ำส้มสายชู

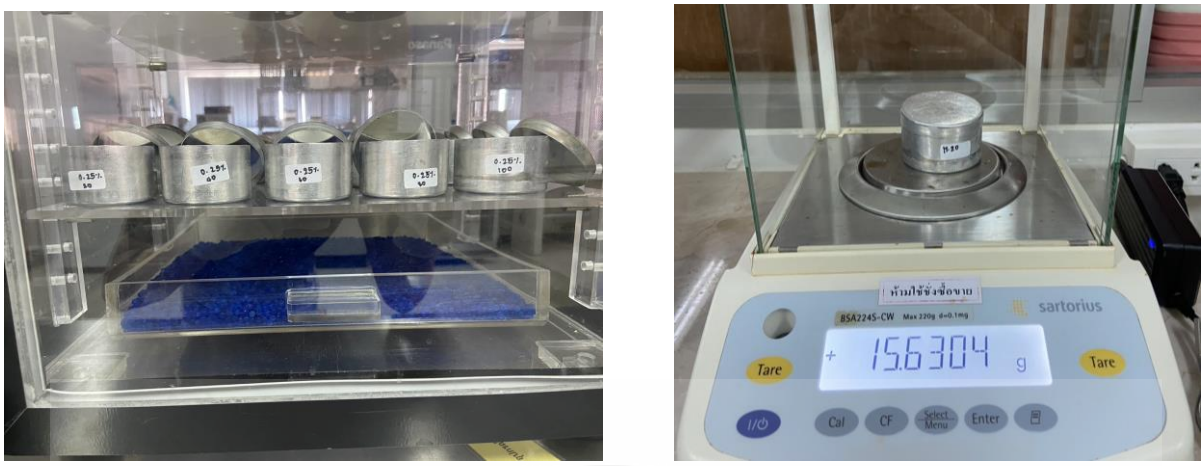
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ ก.5 จุดยุติการไทเทรตหาปริมาณกรดในตัวอย่างน้ำส้มสายชู

ภาพที่ ก.5 การหาปริมาณแอลกอฮอล์ โดยใช้อีบลูลิโอมิเตอร์

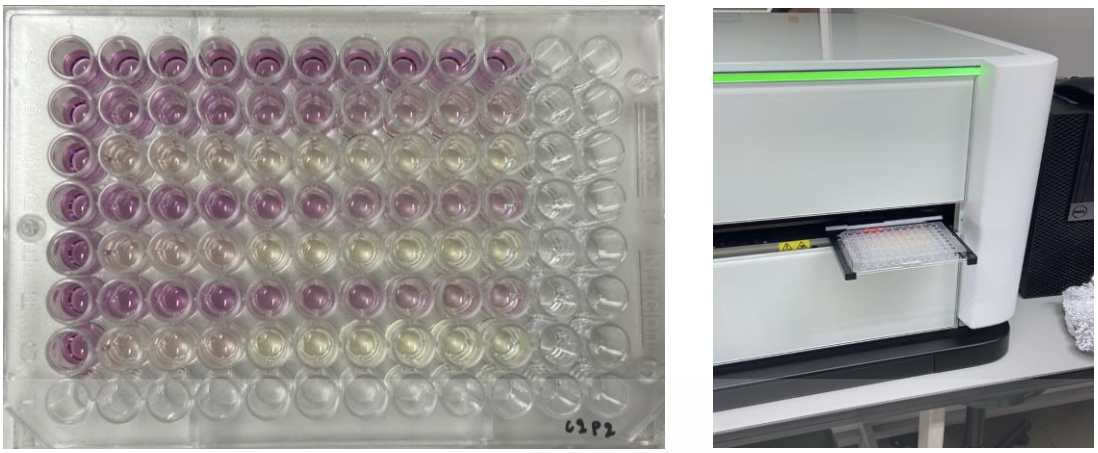
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ ก.6 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

ภาพที่ ก.7 การหาปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด โดยใช้เครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (Microplate Reader)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ ก.8 การหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้เครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (Microplate Reader)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

วิธีการวิเคราะห์

ข.1 วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณกรดโดยวิธีการไทเทรต (จิรภัทร ขันคลาน และคณะ, 2555)

1.1 การเตรียม Phenolpthalene

ชั่ง Phenolpthalene 0.5 กรัม ละลายในเอทานอล 95% ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

1.2 การเตรียมสารละลาย 1 M NaOH

ชั่ง NaOH 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรใน Volumetric flask ขนาด 1 ลิตร จากนั้นหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลาย NaOH (Standarmination of NaOH) ด้วย Potassium Hydrogen Pthalate/KHP ($KHC_8H_4O_6$) โดยการชั่ง KHP 0.5000-0.5200 กรัม และบันทึกน้ำหนักที่ชั่งได้ ต่อมาละลาย KHP ในน้ำกลั่นปริมาตร 25 มิลลิลิตร หยด Phenolpthalene 2-3 หยด ไทเทรตสารละลาย KHP กับ NaOH จนถึงจุดยุติ สังเกตเห็นว่าจุดยุติสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อน บันทึกปริมาตรของ NaOH ที่ใช้ไป จากนั้นนำมาคำนวณค่าความเข้มข้นที่แน่นอนของ NaOH โดยใช้สูตร

$$Normality\ of\ NaOH = \frac{g_{KHP}}{204.23 \times V_{NaOH}} \times 1000$$

โดย g_{KHP} = น้ำหนักของ KHP เป็นกรัมที่ใช้ในการทดลอง

V_{NaOH} = ปริมาตรของ NaOH ที่ใช้ในการไทเทรตสารละลาย KHP

3. การไทเทรทตัวอย่าง

ดูดสารละลายตัวอย่าง 6 มิลลิลิตรลงในขวดรูปชมพู่ หยด Phenolpthalene 2-3 หยด นำไปไทเทรตกับ 1M NaOH ไทเทรตจนกระทั่งถึงจุดยุติ สารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อน บันทึกปริมาตรของ NaOH ที่ใช้ไป คำนวณหาค่าปริมาณกรดโดยใช้สูตร

$$\text{ค่าความเป็นกรด} = \frac{(V)(N)(Eq.Wt)(100)}{(1000)(V)}$$

V = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน NaOH

N = นอร์มัลที่แท้จริงของสารละลายมาตรฐาน NaOH

V = ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้

Eq.Wt. = น้ำหนักสมดุลของกรดทาร์ทาริค (tartaric) = 75, มาลิค (malic)= 67, ซิตริก (citric)= 64,แลคติก (lactic)=90,ซัลฟูริก (sulfuric)=49,อะซิติก (acetic)=60)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.2 การหาน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อ *A. aceti* WK

2.1 วิเคราะห์ปริมาณเซลล์จากน้ำหมัก (Krusong and Vichitraka, 2011)

นำตัวอย่างน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียวที่มีเซลล์ *A. aceti* WK ปริมาณ 50 มิลลิลิตร มาใส่ในหลอดหมุนเหวี่ยงแล้วทำการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จะเกิดการแยกตะกอนกับส่วนใสขึ้น เทส่วนใสออกแล้วทำการล้างด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง จากนั้นนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในหลอดทดลอง อัตราส่วนเจือจาง 100:0 80:20 60:40 40:60 และ 20:80 นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเอาเฉพาะเซลล์มาทำการทดลองปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำไปชั่งน้ำหนัก ส่วนที่เหลือนำไปวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร นำทั้งสองค่ามาหาความสัมพันธ์ โดยทำการพลอตกราฟมาตรฐานระหว่างค่าความขุ่นที่อ่านได้กับน้ำหนักแห้งของเซลล์ จะได้สมการเส้นตรงเพื่อใช้ในการคำนวณค่าน้ำหนักแห้งของเซลล์ (Krusong and Vichitraka, 2011)

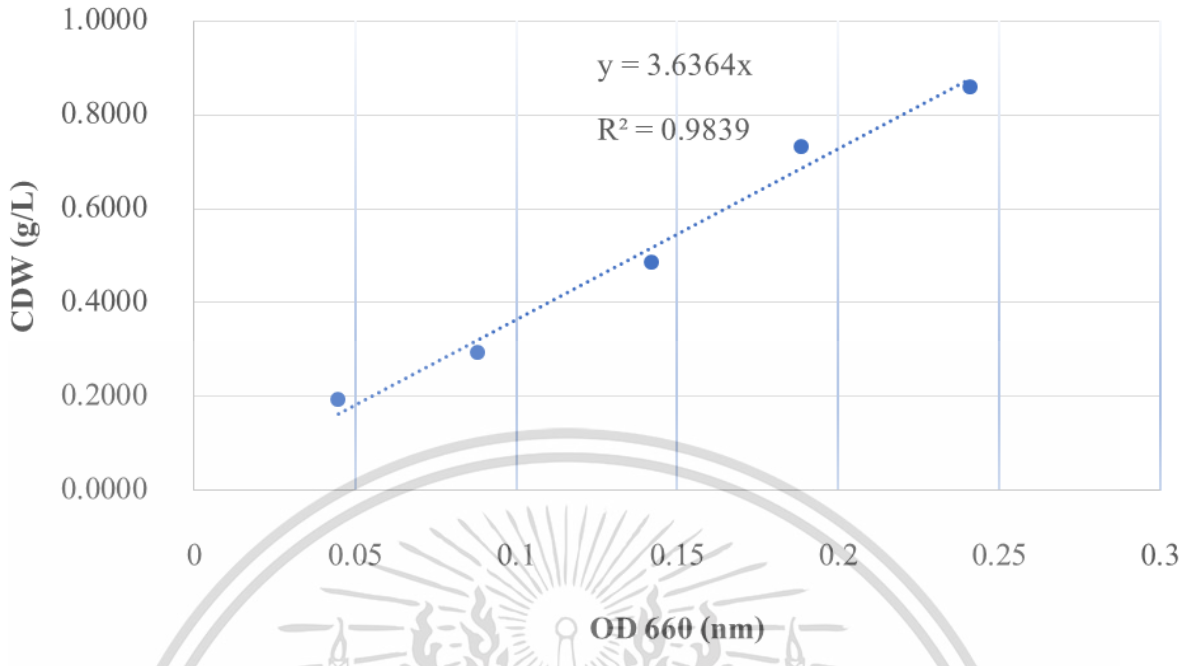
สูตรคำนวณหาปริมาณน้ำหนักแห้งของเซลล์

$$\text{คำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม)} = \frac{(B - A) \times 1{,}000}{\text{ปริมาตรของตัวอย่าง}}$$

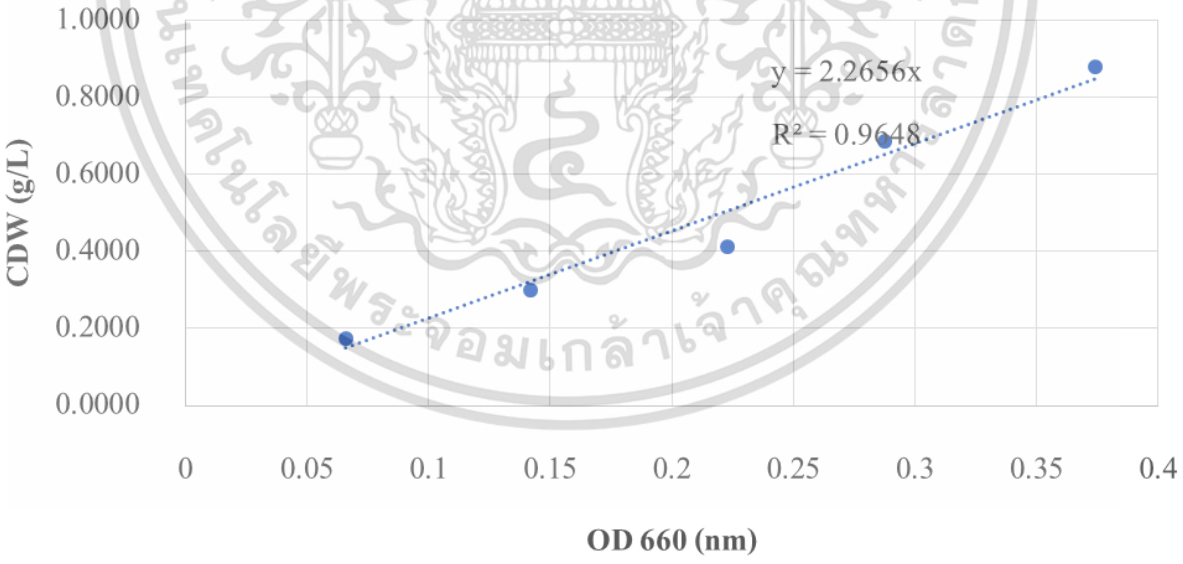
โดย A คือ น้ำหนักอะลูมิเนียมแคนที่ผ่านการอบ

B คือ น้ำหนักตัวอย่างที่อยู่ในอะลูมิเนียมแคนที่ผ่านการอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

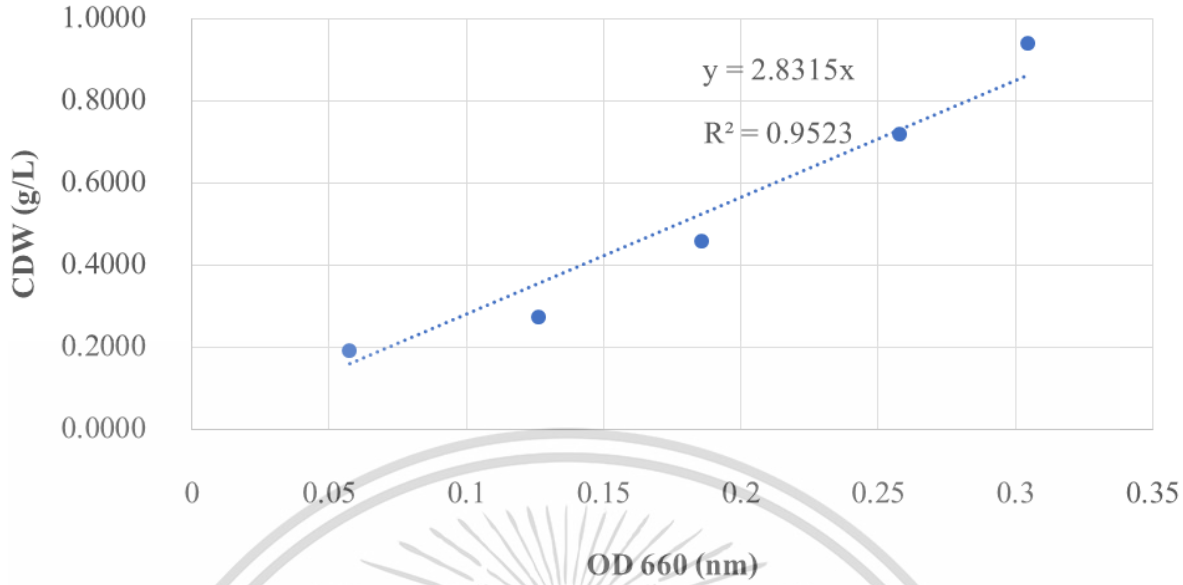


ภาพที่ ข.1 กราฟมาตรฐานน้ำหนักเซลล์แห้งของตัวอย่างน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียว 0.25% (w/v)

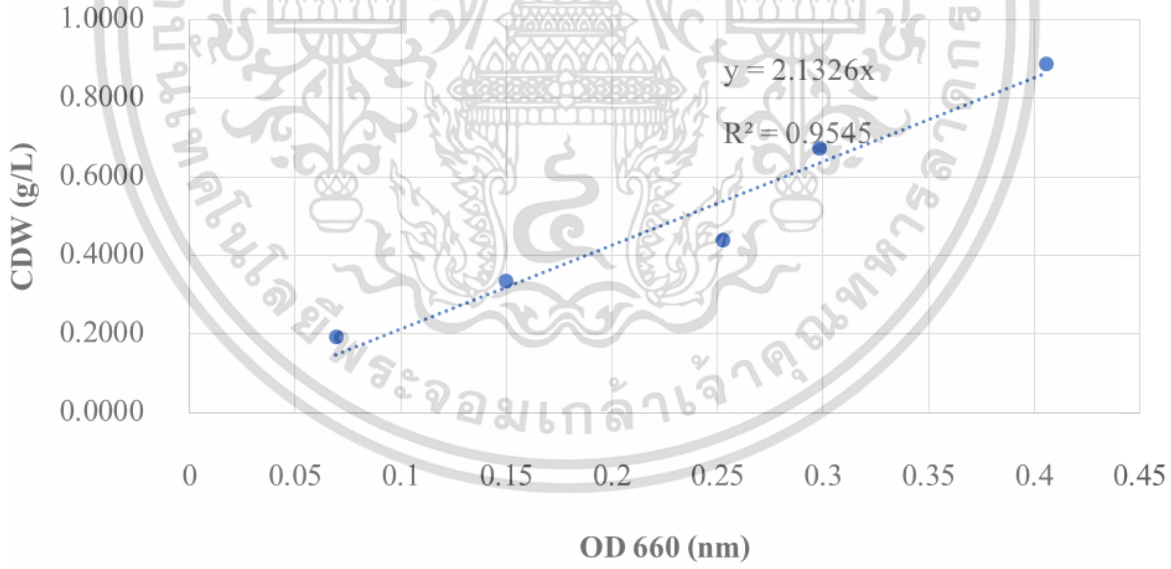


ภาพที่ ข.2 กราฟมาตรฐานน้ำหนักเซลล์แห้งของตัวอย่างน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียว 0.5% (w/v)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ ข.3 กราฟมาตรฐานน้ำหนักเซลล์แห้งของตัวอย่างน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียว 0.75% (w/v)



ภาพที่ ข.4 กราฟมาตรฐานน้ำหนักเซลล์แห้งของตัวอย่างน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียว 1% (w/v)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.3 การวิเคราะห์ปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด ดัดแปลงมาจาก (Brimson et al., 2012)

3.1 สารที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด

3.1.1 Folin ciocalteu reagent

3.1.2 Gallic acid

3.1.3 Sodium carbonate

3.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก

เตรียมกรดแกลลิก ที่มีความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัม/ลิตร โดยชั่ง 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร เจือจางให้ได้ความเข้ม 50 40 30 20 และ10 มิลลิกรัม/ลิตร โดยคำนวณด้วยสูตรต่อไปนี้

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

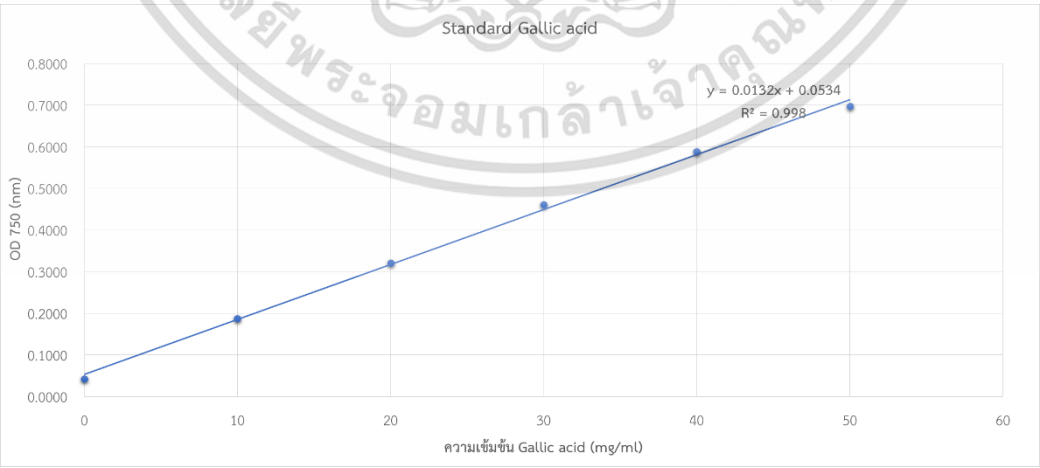
เมื่อ C_1 = ความเข้มข้นของสารละลายเริ่มต้น

V_1 = ปริมาตรของสารละลายที่ต้องการ

C_2 = ความเข้มข้นของสารละลายที่ต้องการ

V_2 = ปริมาตรของสารละลายที่ต้องการ

จากนั้นดูดสารละลายมาตรฐานแกลลิกเจือจางที่ความเข้มข้น 50 40 30 20 และ10 มิลลิกรัม/ลิตร ลงใน 96 well plate ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และ Folin ciocalteu reagent ปริมาตร 50 ไมโครลิตร วางทิ้งไว้ 20 นาที แล้วเติมโซเดียมคาร์บอเนตปริมาตร 35 ไมโครลิตร วางทิ้งไว้อีก 20 นาที หลังจากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปพลอตกราฟมาตรฐาน



ภาพที่ ข.5 กราฟสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 เจือจางตัวอย่างน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียว

น้ำส้มสายชูจากใบชาเขียวเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร เจือจางให้ได้ความเข้มที่ 10 มิลลิกรัม/ลิตร โดยคำนวณด้วยสูตรต่อไปนี้

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

เมื่อ C_1 = ความเข้มข้นของสารละลายเริ่มต้น

V_1 = ปริมาตรของสารละลายที่ต้องการ

C_2 = ความเข้มข้นของสารละลายที่ต้องการ

V_2 = ปริมาตรของสารละลายที่ต้องการ

จากนั้นดูดตัวอย่างน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียวที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/ลิตร ลงใน 96 well plate ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และ Folin ciocalteu reagent ปริมาตร 50 ไมโครลิตร วางทิ้งไว้ 20 นาที แล้วเติมโซเดียมคาร์บอเนตปริมาตร 35 ไมโครลิตร วางทิ้งไว้อีก 20 นาที หลังจากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร บันทึกผล

ข.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ ดัดแปลงมาจาก (Yam et al., 2008)

4.1 สารที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด

4.1.1 Trolox

3.1.2 2,2-Diphenyl-1-Picirylhydrazyl (DPPH)

3.1.3 Methanol

4.2 การเตรียมสารมาตรฐานโทรลอกซ์

เตรียมสารมาตรฐานโทรลอกซ์เข้มข้น 500 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ชั่ง 50 มิลลิกรัม ละลายในเมทานอล ปรับในขวดปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร เจือจางให้ได้ความเข้ม 15 12.5 10 7.5 5 2.5 1 มิลลิกรัม/ลิตร โดยคำนวณด้วยสูตรต่อไปนี้

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

เมื่อ C_1 = ความเข้มข้นของสารละลายเริ่มต้น

V_1 = ปริมาตรของสารละลายที่ต้องการ

C_2 = ความเข้มข้นของสารละลายที่ต้องการ

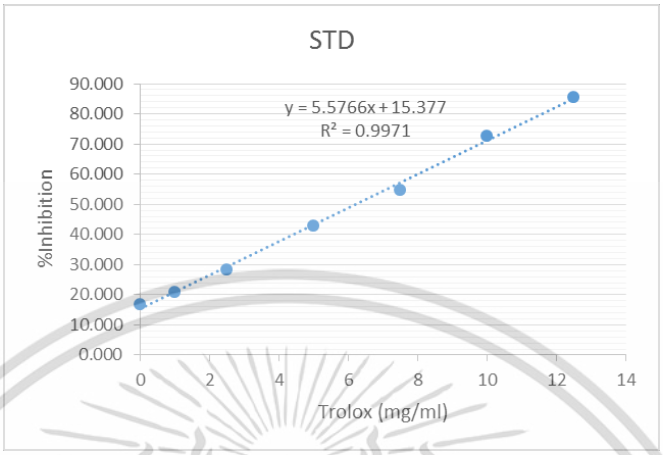
V_2 = ปริมาตรของสารละลายที่ต้องการ

จากนั้นดูดสารละลายมาตรฐาน เจือจางที่ความเข้ม 15 12.5 10 7.5 5 2.5 1 มิลลิกรัม/ลิตร ลงใน 96 well plate ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และสารละลาย DPPH ปริมาตร 100 ไมโครลิตร วางทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที หลังจากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร ค่าที่ได้นำไปคำนวณโดยใช้สูตรดังต่อไปนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$\%Inhibition = \frac{(A_{517control} - A_{517\ sample})}{A_{517control}} \times 100$$

นำค่าที่คำนวณได้ไปพลอตกราฟ ให้แกน X เป็นความเข้มข้นของตัวอย่าง และให้แกน Y เป็น %Inhibition



ภาพที่ ข.6 กราฟสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์

จากนั้นหาความเข้มข้นที่ทำให้เกิดการยับยั้งสารต้านอนุมูลอิสระได้ 50% (IC_{50}) คำนวณจากสมการที่ได้จากการพลอตกราฟ โดย แทนค่า y = 50 จะได้ค่า X คือ IC_{50} ของสารละลายโทลอกซ์

4.3 การเตรียมสารละลาย DPPH

เตรียมสารละลาย DPPH เข้มข้น 0.1 mM ชั่ง 0.0039 กรัม ละลายในเอทานอล และปรับในขวดปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร

4.4 เจือจางตัวอย่างน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียว

น้ำส้มสายชูจากใบชาเขียวเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร เจือจางให้ได้ความเข้มที่ 10 7.5 5 2.5 1 และ0.5 มิลลิกรัม/ลิตร โดยคำนวณด้วยสูตรต่อไปนี้

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

เมื่อ C_1 = ความเข้มข้นของสารละลายเริ่มต้น

V_1 = ปริมาตรของสารละลายที่ต้องการ

C_2 = ความเข้มข้นของสารละลายที่ต้องการ

V_2 = ปริมาตรของสารละลายที่ต้องการ

จากนั้นดูดตัวอย่างน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียวที่ความเข้ม 10 7.5 5 2.5 1 และ0.5 มิลลิกรัม/ลิตรลงใน 96 well plate ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และสารละลาย DPPH ปริมาตร 100 ไมโครลิตร วางทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที หลังจากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปคำนวณโดยใช้สูตรดังต่อไปนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$\%Inhibition = \frac{(A_{517control} - A_{517\ sample})}{A_{517control}} \times 100$$

นำค่าที่คำนวณได้ไปพลอตกราฟ ให้แกน X เป็นความเข้มข้นของตัวอย่าง และให้แกน Y เป็น %Inhibition จากนั้นหาความเข้มข้นที่ทำให้เกิดการยับยั้งสารต้านอนุมูลอิสระได้ 50% (IC_{50}) คำนวณจากสมการที่ได้จากการพลอตกราฟ โดย แทนค่า y = 50 จะได้ค่า X คือ IC_{50} ของตัวอย่างน้ำส้มสายชู

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ข้อมูลการทดลอง

ตารางที่ ค.1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดในตัวอย่างน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียว

Total polyphenol (mg/ml)				
Experiment	**ความเข้มข้นของใบชาเขียว (% w/v)**			
	0.25	**0.50**	**0.75**	**1**
Control	116.742 ± 3.393	245.934 ± 1.393	280.465 ± 1.129	401.086 ± 2.678
Cycle 1	108.742 ± 2.686	215.101 ± 1.071	257.056 ± 1.836	364.848 ± 1.428
Cycle 2	103.335 ± 1.214	190.353 ± 2.500	274.132 ± 2.186	355.429 ± 4.535
Cycle 3	97.424 ± 2.143	196.197 ± 1.379	272.345 ± 1.179	370.884 ± 2.521

ตารางที่ ค.2 ผลการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียว

IC_{50} DPPH activity (mg/mL)				
Experiment	**ความเข้มข้นของใบชาเขียว (% w/v)**			
	0.25	**0.50**	**0.75**	**1**
Control	3.533 ± 0.206	1.410 ± 0.023	1.262 ± 0.002	1.168 ± 0.032
Cycle 1	3.784 ± 0.059	1.959 ± 0.045	1.535 ± 0.171	1.249 ± 0.013
Cycle 2	4.016 ± 0.019	1.923 ±0.020	1.555 ± 0.029	1.431 ± 0.004
Cycle 3	3.558 ± 0.000	2.001 ± 0.005	1.498 ± 0.056	1.343 ± 0.102

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

วิเคราะห์ผลทางสถิติ

ง.1 วิเคราะห์ปริมาณกรดอะซิติกของน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียว โดยใช้วิธีหาค่าความแปรปรวน (Analysis of variance, Duncan)

วิเคราะห์การผลิตกรด ตามแนวตั้งของตารางแสดงผล

Between-Subjects Factors

		N
Concentrate	.25	3
	.50	3
	.75	3
	1.00	3
block	1	4
	2	4
	3	4

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: AcidPD

Source	Type II Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	26.189[a]	5	5.238	10.237	.007
Intercept	1691.238	1	1691.238	3305.422	<.001
Concentrate	24.697	3	8.232	16.090	.003
block	1.492	2	.746	1.458	.305
Error	3.070	6	.512		
Total	1720.497	12			
Corrected Total	29.259	11			

a. R Squared = .895 (Adjusted R Squared = .808)

AcidPD

Duncan[a,b]

		Subset	
Concentrate	N	1	2
.25	3	10.59000	
.50	3	11.13333	
1.00	3	11.46667	
.75	3		14.29667
Sig.		.197	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .512.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

b. Alpha = 0.05.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิเคราะห์อัตราการผลิตกรด (ETA) ตามแนวตั้งของตารางแสดงผล

Between-Subjects Factors

		N
Concentrate	.25	3
	.50	3
	.75	3
	1.00	3
block	1	4
	2	4
	3	4

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: AcidPD

Source	Type II Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.002[a]	5	.000	11.146	.005
Intercept	.091	1	.091	2518.121	<.001
Concentrate	.001	3	.000	10.819	.008
block	.001	2	.000	11.638	.009
Error	.000	6	3.614E-5		
Total	.093	12			
Corrected Total	.002	11			

a. R Squared = .903 (Adjusted R Squared = .822)

AcidPD

Duncan[a,b]

Concentrate	N	Subset 1	Subset 2
.25	3	.07667	
.50	3	.08333	
1.00	3	.08500	
.75	3		.10333
Sig.		.152	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 3.614E-5.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

b. Alpha = 0.05.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ง.2 วิเคราะห์ปริมาณการผลิตเซลล์ อัตราการผลิตเซลล์ ของเชื้อ *A. aceti* WK ในการหมักน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียวที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้วิธีหาค่าความแปรปรวน (Analysis of variance, Duncan)

วิเคราะห์การผลิตเซลล์ ตามแนวตั้งของตารางแสดงผล

Between-Subjects Factors

		N
Concentrate	.25	3
	.50	3
	.75	3
	1.00	3
block	1	4
	2	4
	3	4

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: CellPD

Source	Type II Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	252003.778[a]	5	50400.756	13.313	.003
Intercept	1691020.084	1	1691020.084	446.662	<.001
Concentrate	488.533	3	162.844	.043	.987
block	251515.245	2	125757.623	33.217	<.001
Error	22715.442	6	3785.907		
Total	1965739.304	12			
Corrected Total	274719.220	11			

a. R Squared = .917 (Adjusted R Squared = .848)

CellPD

Duncan[a,b]

Concentrate	N	Subset 1
.50	3	367.84633
.25	3	370.30400
1.00	3	381.33967
.75	3	382.07367
Sig.		.794

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on observed means.
The error term is Mean Square(Error) = 3785.907.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

b. Alpha = 0.05.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิเคราะห์อัตราการผลิตเซลล์ ตามแนวตั้งของตารางแสดงผล

Between-Subjects Factors

		N
Concentrate	.25	3
	.50	3
	.75	3
	1.00	3
block	1	4
	2	4
	3	4

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Cellrate

Source	Type II Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	555.531[a]	5	111.106	5.357	.032
Intercept	8517.874	1	8517.874	410.676	<.001
Concentrate	4.948	3	1.649	.080	.969
block	550.584	2	275.292	13.273	.006
Error	124.447	6	20.741		
Total	9197.852	12			
Corrected Total	679.978	11			

a. R Squared = .817 (Adjusted R Squared = .664)

Cellrate

Duncan[a,b]

Concentrate	N	Subset 1
.50	3	25.80000
.25	3	26.25000
1.00	3	27.15333
.75	3	27.36667
Sig.		.699

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on observed means.
The error term is Mean Square (Error) = 20.741.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

b. Alpha = 0.05.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ง.3 วิเคราะห์หาปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด (Total polyphenol) โดยใช้วิธีหาค่าความแปรปรวน (Analysis of variance, Duncan)

วิเคราะห์ปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด ตามแนวนอนของตารางแสดงผล

CONTROL

Between-Subjects Factors

		N
Tea	.25	2
	.50	2
	.75	2
	1.00	2
block	1	4
	2	4

Polyphenol

Duncan[a,b]

		Subset			
Tea	N	1	2	3	4
.25	2	116.74200			
.50	2		245.93400		
.75	2			280.46500	
1.00	2				401.08600
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on observed means.
The error term is Mean Square(Error) = 3.955.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

b. Alpha = 0.05.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างน้ำส้มาสายชูจากใบชาเขียวแต่ละความเข้มข้น

Between-Subjects Factors

		N
Tea	.25	3
	.50	3
	.75	3
	1.00	3
block	1	4
	2	4
	3	4

Polyphenol

Duncan[a,b]

		Subset			
Tea	N	1	2	3	4
.25	3	103.16700			
.50	3		200.55033		
.75	3			267.84433	
1.00	3				363.72033
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on observed means.
The error term is Mean Square(Error) = 105.345.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

b. Alpha = 0.05.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิเคราะห์ปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด ตามแนวตั้งของตารางแสดงผล

น้ำส้มสายชูจากใบชาเขียว 0.25% (w/v)

Between-Subjects Factors

		N
Cycle	1	2
	2	2
	3	2
	4	2
block	1.000	4
	2.000	4

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Polyphenol

Source	Type II Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	404.634[a]	4	101.159	12.249	.033
Intercept	90840.908	1	90840.908	10999.885	<.001
Cycle	404.622	3	134.874	16.332	.023
block	.012	1	.012	.001	.972
Error	24.775	3	8.258		
Total	91270.318	8			
Corrected Total	429.409	7			

a. R Squared = .942 (Adjusted R Squared = .865)

Polyphenol

Duncan[a,b]

Cycle	N	Subset 1	2	3
4	2	97.42400		
3	2	103.33350	103.33350	
2	2		108.74200	108.74200
1	2			116.74200
Sig.		.132	.156	.069

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on observed means.
The error term is Mean Square(Error) = 8.258.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

b. Alpha = 0.05.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำส้มสายชูจากใบชาเขียว 0.5% (w/v)

Between-Subjects Factors

		N
Cycle	1	2
	2	2
	3	2
	4	2
block	1.000	4
	2.000	4

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Polyphenol

Source	Type II Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	3759.290[a]	4	939.823	262.534	<.001
Intercept	359200.590	1	359200.590	100340.589	<.001
Cycle	3758.791	3	1252.930	349.999	<.001
block	.500	1	.500	.140	.734
Error	10.739	3	3.580		
Total	362970.620	8			
Corrected Total	3770.030	7			

a. R Squared = .997 (Adjusted R Squared = .993)

Polyphenol

Duncan[a,b]

Cycle	N	Subset 1	2	3
3	2	190.35350		
4	2	196.19700		
2	2		215.10100	
1	2			245.93400
Sig.		.054	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on observed means.
The error term is Mean Square(Error) = 3.580.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

b. Alpha = 0.05.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำส้มสายชูจากใบชาเขียว 0.75% (w/v)

Between-Subjects Factors

		N
Cycle	1	2
	2	2
	3	2
	4	2
block	1.000	4
	2.000	4

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Polyphenol

Source	Type II Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	567.240[a]	4	141.810	39.438	.006
Intercept	584281.581	1	584281.581	162491.080	<.001
Cycle	567.217	3	189.072	52.582	.004
block	.022	1	.022	.006	.942
Error	10.787	3	3.596		
Total	584859.608	8			
Corrected Total	578.027	7			

a. R Squared = .981 (Adjusted R Squared = .956)

Polyphenol

Duncan[a,b]

Cycle	N	Subset 1	2	3
2	2	257.05600		
3	2		271.13150	
4	2		272.34850	
1	2			280.46500
Sig.		1.000	.567	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on observed means.
The error term is Mean Square(Error) = 3.596.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

b. Alpha = 0.05.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำส้มสายชูจากใบชาเขียว 1% (w/v)

Between-Subjects Factors

		N
Cycle	1	2
	2	2
	3	2
	4	2
block	1.000	4
	2.000	4

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Polyphenol

Source	Type II Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	2337.091[a]	4	584.273	48.691	.005
Intercept	1113401.301	1	1113401.301	92787.312	<.001
Cycle	2336.945	3	778.982	64.918	.003
block	.146	1	.146	.012	.919
Error	35.998	3	11.999		
Total	1115774.390	8			
Corrected Total	2373.090	7			

a. R Squared = .985 (Adjusted R Squared = .965)

Polyphenol

Duncan[a,b]

Cycle	N	Subset 1	2	3
3	2	355.42900		
2	2	364.84850	364.84850	
4	2		370.88400	
1	2			401.08600
Sig.		.073	.180	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on observed means.
The error term is Mean Square(Error) = 11.999.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

b. Alpha = 0.05.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ง.4 วิเคราะห์หาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidative) โดยใช้วิธีหาค่าความแปรปรวน (Analysis of variance, Duncan)

วิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ ตามแนวนอนของตารางแสดงผล

CONTROL

Between-Subjects Factors

		N
Tea	.25	2
	.50	2
	.75	2
	1.00	2
block	1	4
	2	4

IC50

Duncan[a,b]

Tea	N	Subset 1	Subset 2
1.00	2	1.16800	
.75	2	1.26150	
.50	2	1.40950	
.25	2		3.53300
Sig.		.084	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on observed means.
The error term is Mean Square(Error) = .009.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

b. Alpha = 0.05.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างน้ำส้มาสายชูจากใบชาเขียวแต่ละความเข้มข้น

Between-Subjects Factors

		N
Tea	.25	3
	.50	3
	.75	3
	1.00	3
block	1	4
	2	4
	3	4

IC50

Duncan[a,b]

		Subset		
Tea	N	1	2	3
1.00	3	1.34100		
.75	3	1.52933		
.50	3		1.96100	
.25	3			3.78600
Sig.		.107	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .015.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

b. Alpha = 0.05.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ ตามแนวคอลัมน์ของตารางแสดงผล

น้ำส้มสายชูจากใบชาเขียว 0.25% (w/v)

Between-Subjects Factors

		N
Cycle	1	2
	2	2
	3	2
	4	2
block	1.000	4
	2.000	4

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: IC50

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.312[a]	4	.078	5.928	.088
Intercept	110.856	1	110.856	8423.925	<.001
Cycle	.305	3	.102	7.728	.064
block	.007	1	.007	.529	.520
Error	.039	3	.013		
Total	111.208	8			
Corrected Total	.352	7			

a. R Squared = .888 (Adjusted R Squared = .738)

IC50

Duncan[a,b]

Cycle	N	Subset 1	Subset 2
1	2	3.53300	
4	2	3.55800	
2	2	3.78350	3.78350
3	2		4.01550
Sig.		.117	.136

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on observed means.
The error term is Mean Square(Error) = .013.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

b. Alpha = 0.05.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ในการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำส้มสายชูจากใบชาเขียว 0.5% (w/v)

Between-Subjects Factors

		N
Cycle	1	2
	2	2
	3	2
	4	2
block	1.000	4
	2.000	4

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: IC50

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.463[a]	4	.116	144.052	<.001
Intercept	26.587	1	26.587	33116.004	<.001
Cycle	.462	3	.154	191.843	<.001
block	.001	1	.001	.678	.471
Error	.002	3	.001		
Total	27.052	8			
Corrected Total	.465	7			

a. R Squared = .995 (Adjusted R Squared = .988)

IC50

Duncan[a,b]

Cycle	N	Subset 1	Subset 2
1	2	1.40950	
3	2		1.92300
2	2		1.95850
4	2		2.00100
Sig.		1.000	.071

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on observed means.
The error term is Mean Square(Error) = .001.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

b. Alpha = 0.05.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำส้มสายชูจากใบชาเขียว 0.75% (w/v)

Between-Subjects Factors

		N
Cycle	1	2
	2	2
	3	2
	4	2
block	1.000	4
	2.000	4

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: IC50

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.116[a]	4	.029	3.079	.191
Intercept	17.102	1	17.102	1819.582	<.001
Cycle	.111	3	.037	3.926	.145
block	.005	1	.005	.537	.517
Error	.028	3	.009		
Total	17.246	8			
Corrected Total	.144	7			

a. R Squared = .804 (Adjusted R Squared = .543)

IC50

Duncan[a,b]

Cycle	N	Subset 1
1	2	1.26150
4	2	1.49750
2	2	1.53500
3	2	1.55450
Sig.		.056

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on observed means.
The error term is Mean Square (Error) = .009.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

b. Alpha = 0.05.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำส้มสายชูจากใบชาเขียว 1% (w/v)

Between-Subjects Factors

		N
Cycle	1	2
	2	2
	3	2
	4	2
block	1.000	4
	2.000	4

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: IC50

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.081[a]	4	.020	7.487	.065
Intercept	13.473	1	13.473	4952.487	<.001
Cycle	.078	3	.026	9.561	.048
block	.003	1	.003	1.266	.342
Error	.008	3	.003		
Total	13.563	8			
Corrected Total	.090	7			

a. R Squared = .909 (Adjusted R Squared = .788)

IC50

Duncan[a,b]

Cycle	N	Subset 1	Subset 2	Subset 3
1	2	1.16800		
2	2	1.24900	1.24900	
4	2		1.34300	1.34300
3	2			1.43100
Sig.		.218	.169	.190

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .003.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

b. Alpha = 0.05.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	ธรากร บุษยบริบูรณ์โชติ
วัน เดือน ปี เกิด	14 มกราคม 2544
ประวัติการศึกษา	มัธยมศึกษาตอนปลายโรงเรียนเทพศิรินทร์
	ปัจจุบันศึกษาอยู่ คณะอุตสาหกรรมอาหาร
	หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรมอาหาร
	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ประสบการณ์การทำงาน	องค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย
และผลงานวิจัย	การผลิตน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียว
	(Vinegar production from green tea leaves)

ชื่อ-นามสกุล	ไพลิน ศรีโยหะ
วัน เดือน ปี เกิด	8 พฤศจิกายน 2542
ประวัติการศึกษา	มัธยมศึกษาตอนปลายโรงเรียนนวมินทราชูทิศ อีสาน
	ปัจจุบันศึกษาอยู่ คณะอุตสาหกรรมอาหาร
	หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรมอาหาร
	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ประสบการณ์การทำงาน	สหกรณ์โคนมเชียงใหม่ จำกัด
และผลงานวิจัย	การผลิตน้ำส้มสายชูจากใบชาเขียว
	(Vinegar production from green tea leaves)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้