ศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของคอมบูชาจากชาที่แตกต่างกัน

A Study on Antioxidant Activities of Kombucha Prepared from Different Kinds of Tea

รัตนาภรณ์ สุทธิกรณ์
วรกานต์ พรขุนทด
ศุภารนันท์ กาญจนวาหะ

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของคอมบูชาจากชาที่แตกต่างกัน

A Study on Antioxidant Activities of Kombucha Prepared from Different Kinds of Tea

T149057

รัตนาภรณ์ สุทธิกรณ์
วรกานต์ พรขุนทด
ศุภารนันท์ กาญจนวาหะ

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....149057
วัน,เดือน,ปี.....27 ส.ค. 2560

b.1128799769
i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2558

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

A STUDY ON ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF KOMBUCHA PREPARED FROM DIFFERENT KINDS OF TEA

RATTANAPORN SUTTHIKORN

VORAKAN PORNKHOONTOD

SUPARANAN KANJANAWAHA

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS

FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE

IN INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

DEPARTMENT OF BIOLOGY

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2015

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	ศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของคอมบูชาจากชาที่แตกต่างกัน A Study on Antioxidant Activities of Kombucha Prepared from Different Kinds of Tea		
นักศึกษา	นางสาวรัตนาภรณ์	สุทธิกรณ์	รหัส 55051375
	นางสาววรกานต์	พรขุนทด	รหัส 55051387
	นางสาวศุภารนันท์	กาญจนวาหะ	รหัส 55051401
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)		
ภาควิชา	ชีววิทยา		
ปีการศึกษา	2558		
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดวงใจ โอชัยกุล		

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต(จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2558

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ลินจง สุขลำภู ประธานกรรมการ	
ดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล กรรมการ	
รศ.ดวงใจ โอชัยกุล กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	ศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของคอมบูชาจากชาที่แตกต่างกัน		
นักศึกษา	นางสาวรัตนาภรณ์	สุทธิกรณ์	รหัส 55051375
	นางสาววรกานต์	พรขุนทด	รหัส 55051387
	นางสาวศุภารนันท์	กาญจนวาหะ	รหัส 55051401
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)		
ภาควิชา	ชีววิทยา		
ปีการศึกษา	2558		
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดวงใจ โอชัยกุล		

บทคัดย่อ

โครงงานพิเศษนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ของเครื่องดื่มคอมบูชาที่เตรียมจากใบชาชนิดต่างๆ คือ ชาดำ ชาเขียว และชาอู่หลง และศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการหมักคอมบูชาที่มีผลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ทำการหมักคอมบูชาเป็นระยะเวลา 10 วัน พบว่าชาดำ ชาเขียวและชาอู่หลง มีปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติกเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมัก และชาดำมีปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติกสูง ร้อยละ 2.41 ± 0.00 ในวันสุดท้ายของการหมัก ซึ่งสัมพันธ์กับค่าพีเอชในการหมัก ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงในช่วงวันที่ 7 – 10 ของการหมัก ซึ่งชาดำมีปริมาณฟีนอลิกสูงสุด รองลงมาเป็น ชาเขียว และชาอู่หลง ตามลำดับ และทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอช พบว่าจากการหมัก 10 วัน ชาดำมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงสุด รองลงมาคือ ชาเขียว และชาอู่หลง ตามลำดับ คอมบูชาจากชาดำและ ชาเขียวหมักเป็นเวลา 10 วัน ที่ความเจือจาง 200 เท่า มีร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอช เท่ากับ 58.31 ± 0.62 และ 48.33 ± 1.24 ตามลำดับ ชาอู่หลงที่ความเจือจาง 100 เท่า มีร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอช เท่ากับ 44.72 ± 2.62

คำสำคัญ : การต้านอนุมูลอิสระ คอมบูชา ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	A Study on Antioxidant Activities of Kombucha Prepared from Different Kinds of Tea		
Students	Miss Rattanaporn	Sutthikorn	55051375
	Miss Vorakan	Pornkhoontod	55051387
	Miss Suparanan	Kanjanawaha	55051401
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)		
Department	Biology		
Academic Year	2015		
Advisor	Assoc. Prof. Duangjai Ochaikul		

Abstract

This study focused on the antioxidant activity of kombucha beverage which was prepared from different kinds of tea such as black, green and oolong tea. Moreover, this research studied on optimal period of kombucha fermentation that affects the antioxidant activity. Kombucha was fermented for 10 days. The total acidity (acetic acid) was increased throughout fermentation and the acetic acids content from black fermented tea were 2.41 ± 0.00 at the end of fermentation. It wss related to pH values. The total phenolics contents were the high during 7–10 day of fermentation time. Black femented tea had the highest phenolics contents, followed by green and oolong fermented tea, respectively. Scavenging activity on DPPH was observed to be the highest in black fermented tea at the end of the fermentation time, followed by green and oolong fermented tea, respectively. Kombucha prepared from black tea and green tea was fermented for 10 days. They had 58.31% and 48.33% of scavenging activity on DPPH by 200-fold dilution, respectively. Oolong fermented tea had 44.72 ± 2.62 of scavenging activity on DPPH by 100-fold dilution.

Keyword : antioxidant activity, kombucha, total phenolic compound

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษฉบับนี้จะประสบความสำเร็จไปไม่ได้ หากไม่ได้รับความอนุเคราะห์จากบุคคลหลายท่าน ซึ่งบุคคลแรกที่ต้องกล่าวคำขอบพระคุณเป็นอย่างสูง คือ รศ.ดวงใจ โอชัยกุล ที่คอยให้คำปรึกษาด้านการทดลอง การวางแผนการทำงานและคอยชี้แนะแนวทางในการแก้ไขปัญหาต่างๆ จนทำให้ผู้วิจัยสามารถทำโครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอขอบพระคุณ ผศ. ลินจง สุขลำภู และดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล ที่ให้คำแนะนำด้านการทดลอง ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการและเจ้าหน้าที่ธุรการทุกท่านที่คอยอำนวยความสะดวกในการเบิกอุปกรณ์และสารเคมี ช่วยอำนวยความสะดวกในการติดต่อประสานงานต่างๆ ขอขอบคุณเพื่อนๆพี่ๆน้องๆทุกคน ที่คอยให้คำปรึกษา ให้คำแนะนำ แลกเปลี่ยนความรู้และคอยให้กำลังใจเสมอมา และที่สำคัญอย่างยิ่ง ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัว ที่เป็นแรงผลักดันและให้โอกาสในการศึกษาเสมอมา

คุณความดีใดๆ ที่เกิดขึ้นจากโครงงานพิเศษฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่ บิดา มารดา ครอบครัว ครูบาอาจารย์ที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ ตลอดจนกัลยาณมิตรทั้งหลาย

รัตนาภรณ์ สุทธิกรณ์
วรกานต์ พรขุนทด
ศุภารนันท์ กาญจนวาหะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข

กิตติกรรมประกาศ ..... ค

สารบัญ ..... ง

สารบัญตาราง ..... ช

สารบัญรูป ..... ซ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ 1

1.2 วัตถุประสงค์ 2

1.3 ขอบเขต 2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3

2.1 คอมบูชา 3

2.1.1 ความเป็นมาของคอมบูชา 3

2.1.2 เครื่องดื่มชาหมักคอมบูชา 4

2.2 จุลินทรีย์ที่พบในชาหมักคอมบูชา 6

2.2.1 กลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่ดำเนินกิจกรรมในการหมัก 6

2.2.1.1 จุลินทรีย์กลุ่มโพรไบโอติก 6

2.2.2 แบคทีเรียที่สร้างเซลลูโลส 9

2.2.2.1 *Acetobacter xylinum* 9

2.2.2.2 การสังเคราะห์เซลลูโลส 10

2.2.2.3 การประยุกต์ทางอาหาร 12

2.2.3 ยีสต์ 14

2.2.3.1 ชนิดของยีสต์ 14

2.2.3.2 ความสำคัญของยีสต์ต่ออาหาร 15

2.2.3.3 *Saccharomyces cerevisiae* 15

2.2.3.4 การใช้ *Saccharomyces cereviae* ในอาหาร 16

2.3 ปฏิกิริยาการเกิดชาหมัก 16

2.4 อนุมูลอิสระ 17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

2.4.1 แหล่งกำเนิดอนุมูลอิสระ 18
2.4.1.1 ปัจจัยภายในร่างกาย 18
2.4.1.2 ปัจจัยภายนอกร่างกาย 19
2.5 สารต้านอนุมูลอิสระ 19
2.5.1 ความหมายของสารต้านอนุมูลอิสระ 19
2.5.2 แหล่งที่มาของสารต้านอนุมูลอิสระ 20
2.5.2.1 สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ 20
2.5.2.2 สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ 21
2.5.3 ประเภทของสารต้านอนุมูลอิสระ 21
2.5.3.1 primary antioxidant 22
2.5.3.2 oxygen scavenger 22
2.5.3.3 secondary antioxidant 22
2.5.3.4 enzymic antioxidant 22
2.5.3.5 chelating agent 22
2.5.4 สารต้านอนุมูลอิสระบางชนิด 23
2.5.4.1 วิตามินเอ 23
2.5.4.2 วิตามินซี 24
2.5.4.3 วิตามินอี 25
2.5.5 สารประกอบฟีนอลิก 26
2.5.6 สารต้านออกซิเดชันสังเคราะห์ 27
2.6 การวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ 28
2.6.1 วิธี DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical 28
2.6.2 วิธี Hydroxyl (OH) radical scavenging activity 29
2.6.2.1 ปฏิกิริยาของไอออนโลหะทรานซิชันกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 29
2.6.2.2 การแตกตัวของน้ำ 29
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 30
2.7.1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องของการหมักคอมบูชา 30
2.7.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องของการต้านอนุมูลอิสระ 30
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 33
3.1 อุปกรณ์และสารเคมี 33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

3.1.1 วัตถุดิบ 33
3.1.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง 33
3.1.3 เครื่องมือและอุปกรณ์ 33
3.2 ขั้นตอนในการดำเนินงาน 34
3.2.1 การเตรียมหัวเชื้อชาหมักคอมบูชา 34
3.2.2 การหมักชาคอมบูชา 34
3.2.3 การวิเคราะห์ 34
3.2.3.1 ค่าพีเอชของน้ำหมัก 34
3.2.3.2 ปริมาณกรดทั้งหมด 35
3.2.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด 35
3.2.3.4 วิธีการทดสอบฤทธิ์การกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH 35
3.2.4 วิเคราะห์ทางสถิติ 36
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 37
4.1 ผลการศึกษาการหมักคอมบูชาโดยใช้ชาชนิดต่างๆ 37
4.1.1 ค่าพีเอชของคอมบูชา 37
4.1.2. ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติก 37
4.1.3 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด 38
4.2 การศึกษาฤทธิ์การต่อต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีดีพีพีเอช 50
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง 57
เอกสารอ้างอิง 58
ภาคผนวก 65
ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมี 66
ภาคผนวก ข การวิเคราะห์ทางเคมีและเครื่องมือวิเคราะห์ 67
ภาคผนวก ค ข้อมูลดิบ 70

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

4.1 ค่าพีเอชในคอมบูชาจากการหมักชาชนิดต่างๆ 39

4.2 ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปแบบของกรดอะซิติกในคอมบูชาจากการหมักชาชนิดต่างๆ..... 42

4.3 ปริมาณฟีนอลิกในคอมบูชาจากการหมักชาดำ 45

4.4 ปริมาณฟีนอลิกในคอมบูชาจากการหมักชาเขียว..... 46

4.5 ปริมาณฟีนอลิกในคอมบูชาจากการหมักชาอู่หลง 47

4.6 ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชของชาดำ..... 51

4.7 ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชของชาเขียว..... 52

4.8 ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชของชาอู่หลง..... 53

ข-1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก..... 68

ค-1 ค่าพีเอชจากการหมักชาชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน..... 70

ค-2 ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติกที่ได้จากการหมักชาชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิห้อง..... 72
เป็นเวลา 10 วัน

ค-3 ปริมาณฟีนอลิกในคอมบูชาจากการหมักชาดำ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน 74

ค-4 ปริมาณฟีนอลิกในคอมบูชาจากการหมักชาเขียว ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน..... 77

ค-5 ปริมาณฟีนอลิกในคอมบูชาจากการหมักชาอู่หลง ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน 80

ค-6 ร้อยละของการต่อต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชของชาหมักคอมบูชาจากชาดำ ที่หมักที่ 83
อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน

ค-7 ร้อยละของการต่อต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชของชาหมักคอมบูชาจากชาเขียว ที่หมักที่..... 86
อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน

ค-8 ร้อยละของการต่อต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชของชาหมักคอมบูชาจากชาอู่หลง ที่หมักที่ 89
อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	แสดงลักษณะหัวเชื้อคอมบูชา	3
2.2	แสดงชาหมักคอมบูชา	5
2.3	แสดงประเภทของผลิตภัณฑ์อาหารที่มีส่วนผสมของโพรไบโอติก	8
2.4	แสดงลักษณะของ *Acetobacter xylinum*	9
2.5	แสดงลักษณะของเส้นใยและแผ่นเซลลูโลสที่แบคทีเรียสร้างขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ	11
2.6	แสดงโครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส	11
2.7	แสดงลักษณะเส้นใยเซลลูโลส	12
2.8	แสดงวุ้นมะพร้าว	13
2.9	แสดงชาเห็ด หรือ tea kvassor tea-fungus	13
2.10	แสดงลักษณะเซลล์ของ *Saccharomyces cerevisiae*	15
2.11	แสดงโครงสร้างทางเคมีของสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์	21
2.12	แสดงโครงสร้างของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง EDTA กับโลหะไอออน	23
2.13	แสดงกลไกการหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของสารต้านอนุมูลอิสระ	23
2.14	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างวิตามินอี วิตามินซีและกลูตาไทโอน	24
2.15	แสดงโครงสร้างทางเคมีของวิตามินซี	25
2.16	แสดงโครงสร้างทางเคมีของวิตามินอี	26
2.17	แสดงโครงสร้างทางเคมีของ DPPH radical	29
4.1	ค่าพีเอชในคอมบูชาจากการหมัก	40
4.2	เปรียบเทียบค่าพีเอชในคอมบูชาจากการหมักชาชนิดต่างๆ	41
4.3	ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดอะซิติกในคอมบูชาจากการหมัก	43
4.4	เปรียบเทียบปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดอะซิติก	44
4.5	ปริมาณฟีนอลิกในคอมบูชาจากการหมัก	48
4.6	เปรียบเทียบปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในคอมบูชาจากการชาชนิดต่างๆ	49
4.7	ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชของชาหมักคอมบูชา	54
4.8	เปรียบเทียบร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชของขาชนิดต่างๆ	55
4.9	แสดงร้อยละการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชในวันที่ 10 ของการหมักคอมบูชาจากชาดำ ชาเขียว และชาอู่หลง	56
ข-1	กราฟมาตรฐานกรดแกลลิกโดยวิธี Folin-Ciocalteu Colorimetric Method ที่ความยาวคลื่น 690 นาโนเมตร	69

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เนื่องจากปัจจุบันนี้มีผู้ให้ความสนใจในเรื่องของสุขภาพเป็นอย่างมาก ทั้งในด้านของการส่งเสริมสุขภาพ โดยการรับประทานอาหารที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ รวมถึงการรับประทานวิตามินสังเคราะห์ หรือในด้านการรักษาสุขภาพโดยทั่วไปที่จะต้องใช้ยาที่ผลิตจากสารเคมี ซึ่งผลิตภัณฑ์ยาเหล่านั้นอาจก่อให้เกิดสารตกค้างต่อร่างกาย หากได้รับเป็นระยะเวลานาน จะส่งผลกระทบต่อร่างกายได้ในอนาคต (ฉัตรชัย, 2556) ทั้งนี้หากสามารถใช้สิ่งอื่นที่ส่งผลกระทบน้อยกว่า แต่มีคุณประโยชน์ใกล้เคียงกัน เพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับการดูแลรักษาสุขภาพ และเครื่องดื่มชาเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ พบว่าในใบชามีสารที่เป็นประโยชน์มากมาย (Dufresne และ Farnworth, 2000) เช่น โพลิฟีนอล (polyphenol) ฟลาโวนอล (flavonol) และ ฟลาโวนอลไกลโคไซด์ (flavonolglycoside) พวกเควอซิทิน (quercetin) แคมฟีรอล (kaempferol) และมายริซิทิน (myricetin) คาเฟอีน และกรดอะมิโน (ธีรพงษ์, 2555) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในชานั้นมีสารต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากสารดังกล่าวสามารถป้องกันหรือชะลอกระบวนการเกิดออกซิเดชันในร่างกาย เช่น ช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ช่วยย่อยอาหาร ป้องกันการเกิดเซลล์มะเร็ง ป้องกันโรคหลอดเลือดหัวใจ และป้องกันการติดเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค (Chen และ Liu, 2000; Greenwalt และคณะ, 2000; Malbasa และคณะ, 2008; Chu และ Chen, 2006; Malbasa และคณะ2011; Aloulou และคณะ 2012; Ilicic และคณะ, 2012; Yang และคณะ, 2009; Greenwalt และคณะ, 1998) การรับประทานเครื่องดื่มชาที่ได้จากธรรมชาติ จะไม่ทำให้เกิดสารตกค้างหรือสะสมสารพิษในร่างกาย (ฉัตรชัย, 2556) และยิ่งไปกว่านั้นชาที่ผ่านกระบวนการหมักร่วมกับจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในกลุ่มจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์ ที่ประกอบด้วยจุลินทรีย์จำพวกยีสต์และแบคทีเรีย โดยอาศัยสภาวะพึ่งพาอาศัยกัน (Symbiotic) เช่น *Saccharomyces cerevisiae* และ *Acetobacter xylinum* เป็นต้น นอกจากนี้อาจพบจุลินทรีย์ชนิดอื่นในกระบวนการหมักอีก ซึ่งการหมักของคอมบูชาจะทำให้เพิ่มคุณประโยชน์ของเครื่องดื่มชาอีกทั้งยังได้รสชาติของชาที่แปลกใหม่ต่างจากชาปกติทั่วไปคือ มีรสชาติที่เป็นเอกลักษณ์ ให้ความสดชื่น รสหวานเล็กน้อยอมเปรี้ยว เนื่องจากมีส่วนผสมของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และแอลกอฮอล์ปนอยู่ด้วย และนอกจากนี้ คอมบูชายังมีประโยชน์ด้านการส่งเสริมสุขภาพอื่นๆอีกมากมาย เช่น ช่วยระบบขับถ่าย ลดคอเลสเตอรอล ลดความดันโลหิต ช่วยการทำงานของตับและขับสารพิษ เป็นต้น เนื่องจากคอมบูชาเป็นเครื่องดื่มที่ปลอดภัย ทั้งยังมีประโยชน์ต่อร่างกาย แพทย์ทางเลือกทั้งในประเทศจีนและยุโรปตะวันออกจึงใช้คอมบูชาเพื่อช่วยฟื้นฟูผู้ป่วยจากโรคต่างๆ (ฉัตรชัย, 2556)

ปัจจุบันมีงานวิจัยและข้อมูลทางวิทยาศาสตร์มากมายที่บ่งชี้คุณประโยชน์ของคอมบูชาต่อสุขภาพเกี่ยวกับการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของคอมบูชา เช่น งานวิจัยของ Jayabalan และคณะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(2008) ที่ได้ทำการตรวจสอบคอมบูชาที่เตรียมจากชาเขียว ชาดำ และกากชา พบว่าในคอมบูชามีสารประกอบฟีนอลิก และมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอช อนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ และอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล

โครงงานพิเศษนี้ได้ทำการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของเครื่องดื่มชาหมักคอมบูชา โดยศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระชนิดต่างๆของคอมบูชาที่ใช้วัตถุดิบเป็นชาสามชนิด ได้แก่ ชาดำ ชาเขียว และชาอู่หลง เพื่อศึกษาชนิดของชาที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้สูง โดยตรวจสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) และการวัดปริมาณสารฟีนอลิกในคอมบูชาที่เตรียมจากชาทั้งสามชนิด

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1.2.1 ศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของเครื่องดื่มคอมบูชา ที่เตรียมจากใบชาชนิดต่างๆ คือ ชาดำ ชาเขียว และชาอู่หลง

1.2.2 ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการหมักคอมบูชา ที่ทำให้ชาหมักแต่ละชนิดมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้สูง

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

หมักชาสามชนิด คือ ชาดำ ชาเขียว และ ชาอู่หลง หมักเป็นเวลา 10 วัน เก็บตัวอย่างทุกวัน นำมาวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอช ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติก และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH รวมทั้งปริมาณฟีนอลิกที่มีอยู่ในชาหมักแต่ละชนิด

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทำให้ทราบชนิดของชาที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพ และระยะเวลาที่เหมาะสมในการหมักชาเพื่อให้มีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระได้สูงของเครื่องดื่มคอมบูชา อีกทั้งเป็นแนวทางในการปรับปรุงและพัฒนาการผลิตเครื่องดื่มคอมบูชาในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 คอมบูชา

2.1.1 ความเป็นมาของคอมบูชา

สมัยราชวงศ์จิ้น (พ.ศ. 212) มีความเชื่อว่าน้ำหมักชีวภาพหรือที่เรียกกันว่า ชาเห็ดแดง เป็นชาอมฤต ที่เกิดจากการหมักชาจนเกิดเป็นแผ่นวุ้นขึ้น เนื่องจากแผ่นวุ้นมีลักษณะคล้ายเห็ดแดง จึงเรียกว่าเห็ดแดง จากนั้นความรู้นี้ได้เผยแพร่ไปยังประเทศเกาหลี ในคริสต์ศักราช 414 โดยนายแพทย์ชื่อ คอมบู (Kom-Bu) ได้นำชาหมักถวายแก่พระจักรพรรดิแห่งญี่ปุ่น โดยเชื่อว่าสามารถรักษาได้สารพัดโรค จึงถูกเรียกว่า คอมบูชา และความเชื่อนี้ได้แผ่ขยายไปยังอินเดียและรัสเซีย ในประเทศรัสเซียก็เรียกน้ำหมักชาชนิดนี้ว่า Kombucha เช่นกัน หลังจากนั้นชาหมัก ที่เป็นชาหมักเพื่อสุขภาพได้รับความนิยมในหมู่ผู้สนใจด้านการแพทย์ทางเลือก จนได้รับความนิยมอย่างสูงในยุโรป และได้แผ่ขยายไปจนถึงประเทศสหรัฐอเมริกา
(http://www.watkhaosukim.com/sara/download/03_kombucha.pdf, 11 ตุลาคม 2558)

รูปที่ 2.1 แสดงลักษณะหัวเชื้อคอมบูชา
ที่มา : http://longbeachkombucha.com/product/kombucha-scoby
(11 ตุลาคม 2558)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 เครื่องดื่มชาหมักคอมบูชา (Kombucha) (สายสมร, 2557)

เครื่องดื่มคอมบูชาเป็นน้ำหมักชีวภาพชนิดหนึ่ง เป็นเครื่องดื่มสุขภาพที่ปลอดภัยมาก มีถิ่นกำเนิดในประเทศจีนมานานกว่า 2000 ปี ชาวจีนนิยมดื่มกันมาก และในปัจจุบันเครื่องดื่มคอมบูชาได้แพร่หลายไปยังประเทศต่างๆทั่วโลก เป็นที่นิยมทั้งในยุโรปและอเมริกา ในกระบวนการหมักจะไม่เกิดสารพิษใดๆ อีกทั้งจุลชีพที่ใช้ในกระบวนการหมักเป็นเชื้อกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับอุตสาหกรรมอาหารทั้งสิ้น ไม่ว่าจะเป็นยีสต์และแบคทีเรีย ล้วนแล้วแต่เป็นจุลชีพที่ดี ซึ่งเกิดจากกระบวนการหมักของจุลชีพกลุ่มที่ดีที่เป็นโพรไบโอติก จนเกิดเป็นแผ่นวุ้นขึ้น รสชาติของชาหมักจะมีรสหวานเล็กน้อยและมีรสออกเปรี้ยว คล้ายกับเครื่องดื่มไซเดอร์ (Cider) เนื่องจากมีส่วนผสมของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และแอลกอฮอล์ปนอยู่ด้วย

สารที่เป็นองค์ประกอบที่สำคัญในเครื่องดื่มชาหมัก คือ ฟรุกโตส กรดอะซิติก กรดกลูโคนิค และสารดีแซคคาริก แอซิด 1,4 แลคโตน (D-saccharic acid-1,4-lactone, DSL) เป็นสารที่ช่วยส่งเสริมให้ตับขับสารพิษและสารก่อมะเร็งได้ดีขึ้น เช่นเดียวกับกรดกลูคูโรนิก เนื่องจากสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เบต้ากลูคูโรนิเดส (β-glucuronidase) ที่สังเคราะห์จากแบคทีเรียอีโคไล (*Escherichia coli*) ที่อาศัยในลำไส้ใหญ่ ทำหน้าที่ปลดปล่อยสารพิษออกมาและดูดซึมกลับเข้าสู่ร่างกาย มีงานวิจัยที่บ่งชี้ว่า ในคนที่มีการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้สูง มีโอกาสเป็นมะเร็งลำไส้ใหญ่สูงกว่าคนทั่วไป เนื่องจากสารก่อมะเร็งที่ถูกกำจัดทิ้งโดยกระบวนการกลูคูโรนิเดชั่น (กระบวนการกลูคูโรนิเดชั่น เป็นกระบวนการกำจัดของเสียและสารพิษออกจากร่างกาย สารพิษที่เข้าสู่ร่างกายจะเข้าสู่ตับ และถูกกำจัดออกนอกร่างกายโดยสารพิษจะรวมตัวกับกรดกลูคูโรนิก เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกลูคูโรไนด์ (glucuronide complex) สารประกอบที่เกิดขึ้นมีความเป็นพิษน้อยลงหรือหมดความเป็นพิษ ซึ่งผ่านออกจากตับทางท่อน้ำดี เข้าสู่ลำไส้ใหญ่และกำจัดทิ้งทางอุจจาระ) จะถูกปลดปล่อยโดยเอนไซม์ชนิดนี้ และดูดซึมเข้าสู่ผนังลำไส้ใหญ่ และยังมีสารต้านอนุมูลอิสระหลายชนิด เช่น โพลีฟีนอล รวมทั้งทีเฟลวิน และทีรูบิกินซึ่งพบในปริมาณที่สูงกว่าในชาดำ ปริมาณโพลีฟีนอลที่สูง ทำให้การต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น ช่วยปกป้องร่างกายจากการทำลายของอนุมูลอิสระได้ดียิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังตรวจพบสารต้านจุลชีพก่อโรคและสารต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งบางชนิด นอกจากนี้ยังพบว่ามีเอทิลกูลโคเนต (ethyl-gluconate) กรดออกซาลิค (oxalic acid) กรดแซคคาริก (saccharic acid) กรดคีโตไกลโคนิค (ketoglyconic acid) กรดซัคซินิค (succinic acid) และกรดคาร์บอนิก (carbonic acid) ในปริมาณเล็กน้อย รวมทั้งมีวิตามินและเกลือแร่ต่างๆ ที่จำเป็นต่อร่างกายอีกหลายชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.2 แสดงชาหมักคอมบูชา

ที่มา : https://www.google.co.th/search?ชามหมักคอมบูชา

(11 ธันวาคม 2558)

การผลิตเครื่องดื่มชาหมัก ทำได้โดยการนำใบชาดำมาต้มในน้ำเดือด เพื่อสกัดสารอาหาร และแร่ธาตุต่างๆ ออกจากใบชา เติมน้ำตาลซูโครสในปริมาณที่พอเหมาะเพื่อใช้เป็นแหล่งสารอาหารในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ จากนั้นเติมกล้าเชื้อจุลินทรีย์และบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 -10 วัน เพื่อให้จุลินทรีย์ดำเนินกิจกรรมการหมัก ขั้นตอนสำคัญของการผลิตชาหมัก คือ การควบคุมกิจกรรมการหมัก ซึ่งมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายปัจจัย ได้แก่ ชนิด และปริมาณรวมทั้งสัดส่วนของกล้าเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก คุณภาพของใบชาที่นำมาใช้เป็นวัตถุดิบ ลักษณะหัวเชื้อคอมบูชาแสดงดังภาพที่ 2.1 เนื่องจากชนิดของใบชาจะมีผลต่อความแตกต่างขององค์ประกอบสำคัญทางเคมีของปริมาณของแข็งที่สกัดได้ เช่น ปริมาณ caffeine theophyline theobromine และ polyphenol โดยเฉพาะสารสำคัญในกลุ่ม polyphenol คือ catechins ซึ่งมีสมบัติเป็น bacteriostatic สามารถช่วยยับยั้งการเจริญของ *Streptococcus mutans* และจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคอื่นๆ ในชาเขียวพบว่ามีปริมาณ catechins มากถึงร้อยละ 34 แต่ในชาดำมีเพียงร้อยละ 4.2 ส่วนองค์ประกอบอื่นๆ ไม่มีความแตกต่าง ยกเว้น thearubingens ที่มีในชาดำมากถึงร้อยละ 17 แต่ไม่พบในชาเขียว (Stag และ Millin, 1975) ทำให้คุณภาพชาหมักที่ได้มีคุณภาพแตกต่างกัน ชาหมักคอมบูชาแสดงดังภาพ 2.2 อย่างไรก็ตามในการผลิตชาหมักส่วนใหญ่ แล้วจะใช้ใบชาดำมากกว่าชาชนิดอื่น เนื่องจากคุณภาพชาหมักที่ได้จะมีสี กลิ่น รสชาติที่เฉพาะและเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค แม้ว่าจะมีเครื่องดื่มชาหมักที่ผลิตขึ้นจากชาเขียว แต่ก็ได้รับการยอมรับน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบการผลิตที่ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากชาดำ(http://www.madikombucha.com, https://mekongcuisine.wordpress.com/งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง, 11 ตุลาคม 2558)

2.2 จุลินทรีย์ที่พบในชาหมักคอมบูชา

2.2.1 กลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่ดำเนินกิจกรรมในการหมัก

กลุ่มแบคทีเรียและยีสต์ (Greenwalt และคณะ, 2000, Liu และคณะ, 1996) โดยกลุ่มแบคทีเรียที่พบจะเป็นชนิดต้องการอากาศในการเจริญเติบโต และสามารถสร้างเส้นใยเซลลูโลสที่มีลักษณะคล้าย surface mold หรือ mushroom ส่วนกลุ่มยีสต์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการหมัก คือ กลุ่มยีสต์ที่สามารถผลิตแอลกอฮอล์ และยังมีงานวิจัยที่ได้ทำการศึกษาการแยก เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตชาหมักจากแหล่งผลิตในประเทศไต้หวัน 3 แหล่ง (Liu และคณะ, 1996) ได้แก่ Taipei, Hsinchu และ Chiayi พบว่ามีกลุ่มแบคทีเรีย *Acetobacter* และยีสต์ เมื่อนำเชื้อจุลินทรีย์ทั้งสองกลุ่มที่ได้มาจำแนกโดยอาศัยความแตกต่างของคุณสมบัติทางชีวเคมีและทางกายภาพ พบว่า เป็นแบคทีเรียกลุ่ม *A. aceti*, *A. xylinum* และ *A. pasteurianus* ซึ่งมีคุณสมบัติเฉพาะคือสามารถผลิตเซลลูโลสได้ สำหรับยีสต์ที่จำแนกได้ คือ *S. cerevisiae*, *B. bruxellensis* และ *Z. balilii* ซึ่ง ยีสต์กลุ่มนี้ส่วนใหญ่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์และอาหารหมัก ซึ่งมีคุณสมบัติเด่น คือ สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีความเป็นกรดสูงและมีน้ำตาลสูง นอกจากนี้ยังอาจพบยีสต์ชนิดอื่นบ้างแต่ไม่ค่อยมีความสำคัญกับกระบวนการหมัก ได้แก่ *C. tropicalis*, *Debaryomyces hansenii*, *Torulopsis famata* และ *Pichia membranefacience* เป็นต้น (http://yaamata.blogspot.com/2011/10/kombucha.html, 11 ตุลาคม 2558)

2.2.1.1 จุลินทรีย์กลุ่มโพรไบโอติก

โพรไบโอติก (probiotic) องค์การอนามัยโลก (WHO) และองค์การอาหารและการเกษตรแห่งสหประชาชาติ (FAO) ปี ค.ศ. 2002 ได้ให้คำจำกัดความของ โพรไบโอติก คือ "จุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิต เมื่อรับประทานหรือกินเข้าไปโดยมนุษย์หรือสัตว์ในปริมาณที่เพียงพอและเหมาะสม จะก่อให้เกิดผลดีต่อสุขภาพของร่างกายของสิ่งมีชีวิตนั้น ดังนั้น โพรไบโอติกจึงเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย ซึ่งมีคุณสมบัติที่ช่วยป้องกันหรือทำลายจุลินทรีย์ก่อโรคที่จะเข้ามาบุกรุกและทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร ช่วยปรับสภาพสมดุลของกลุ่มจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารและจุลินทรีย์ที่ดีเหล่านี้จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยอาหารและการดูดซึมอาหารได้ดีขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากจุลินทรีย์ที่มีชีวิตแล้ว (live cell) ประโยชน์ของจุลินทรีย์ต่อสุขภาพในรูปแบบจุลินทรีย์เซลล์ตาย (dead cell) และ/หรือส่วนประกอบของจุลินทรีย์ (component of cell) เช่น โปรตีน (protein) ของเซลล์ สารพันธุกรรมอย่าง ดีเอ็นเอ (DNA) หรือ อาร์เอ็นเอ (RNA) ผนังเซลล์ (cell wall) เยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane หรือ cytoplasmic membrane) ซึ่งอาจเป็นน้ำตาลหลายโมเลกุล เรียกว่า เอกโซโพลีแซคคาไรด์ (exopolysaccharide; EPS) หรือส่วนที่เป็นลิปิดหรือไขมันต่อกับน้ำตาลหลายโมเลกุล เรียกว่า ลิโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide; LPS) หรือส่วนประกอบอื่น ๆ ของเซลล์ก็มีบทบาทกับการพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพในปัจจุบัน จึงทำให้นิยามของโพรไบโอติกนั้นหมายรวมทั้งจุลินทรีย์ในรูปแบบเซลล์ที่มีชีวิต รูปแบบเซลล์ตายและส่วนประกอบของจุลินทรีย์ที่สามารถก่อให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพได้ (Chuang และคณะ, 2007; Maeda และคณะ, 2009 ; Nan Li และคณะ, 2009)

จุลินทรีย์โพรไบโอติกส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียกลุ่มสร้างกรดแลคติก (lactic acid bacteria) เช่น แลคโตบาซิลลัส (*Lactobacillus)* ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus, L. bulgaricus, L.casei, L. fermigatus* และ *L. plantarum* บิฟิดิโอแบคทีเรียม (*Bifidobacterium*) ได้แก่ *Bifidobacterium adolescentis, B. animalis, B. bifidum, B. infantis* และ *B. thermophilus* เพ็ดดิโอค็อกคัส (*Peddiococcus)* ได้แก่ *Peddiococcus acidilactocii, P. cerevisiae* และ *P.pentosaceus* นอกจากแบคทีเรียแล้ว ยังมีจุลินทรีย์กลุ่มยีสต์ได้แก่ *Candida pintoleppesii* และ *Saccharomyces cerevisiae* และรา ได้แก่ *Aspergillus niger* และ *A. oryzae* เป็นต้น

ประเภทของผลิตภัณฑ์อาหารที่มีส่วนผสมของโพรไบโอติก (Bielecka และ Maria, 2007) แสดงดังภาพ 2.3 มีรูปแบบที่หลากหลาย สามารถจำแนกได้ดังนี้

1. อาหารทั่วไป ได้แก่ โยเกิร์ต น้ำนม เนยแข็ง ฯลฯ
2. ผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยว ได้แก่ ยาคูลท์ แอคติเมลดานอน แอลซี 1 เนสเล่ย์ และอื่นๆ
3. ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ได้แก่ อาหารที่อยู่ในรูปแคปซูลและรูปแบบอื่นๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.3 แสดงประเภทของผลิตภัณฑ์อาหารที่มีส่วนผสมของโพรไบโอติก

ที่มา : http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/0780/probiotic-โพรไบโอติก (14 ธันวาคม 2558)

ประโยชน์ของโพรไบโอติกต่อสุขภาพ เช่น ช่วยให้จุลินทรีย์ในลำไส้เกิดความสมดุล ช่วยป้องกันหรือทำให้อวัยวะภายในร่างกายที่สัมพันธ์กับทางเดินอาหารทำงานอย่างถูกต้อง นอกจากนี้ Bielecka และ Maria (2007) ได้กล่าวถึงประโยชน์ของโพรไบโอติกที่ดีต่อสุขภาพดังนี้ เพิ่มคุณค่าทางอาหาร (ช่วยให้การย่อยดีขึ้น เพิ่มการดูดซึมของแร่ธาตุและวิตามิน) ป้องกันการติดเชื้อในลำไส้ ลดการตอบสนองต่อการอักเสบ ป้องกันมะเร็ง ลดคอเรสเตอรอลในซีรั่ม ป้องกันการเกิดโรคกระดูกพรุน ช่วยให้สุขภาพดีขึ้น นอกจากนี้โพรไบโอติกยังมีประโยชน์ต่อสุขภาพในด้านการป้องกันการเกิดโรคและอาการต่าง ๆ (Schmid และคณะ, 2006) เช่น กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน โดยเฉพาะโพรไบโอติกสายพันธุ์ Lactic Acid Bacteria (LAB) ให้ผลดีในการตอบสนองระบบภูมิคุ้มกันทั้งแบบไม่จำเพาะและแบบจำเพาะ โรคท้องร่วง พบว่า *Lactobacillus rhamnosus* GG สามารถป้องกันหรือบรรเทาอาการท้องร่วงในเด็กซึ่งเกิดจากเชื้อไวรัสโรตาได้ โรคลำไส้อักเสบ พบว่าโพรไบโอติกสามารถช่วยบรรเทาอาการอักเสบหลังการผ่าตัด ช่วยรักษาอาการเปื่อยของแผลในลำไส้และรักษาโรคลำไส้อักเสบเรื้อรัง (Crohn 's Disease) ป้องกันฟันผุ พบว่าเด็กเล็กที่ดื่มนมที่มีส่วนผสมของ *Lactobacillus rhamosus* GG (LGG) มีปัญหาฟันผุที่น้อยลง (Goldin, 2011)

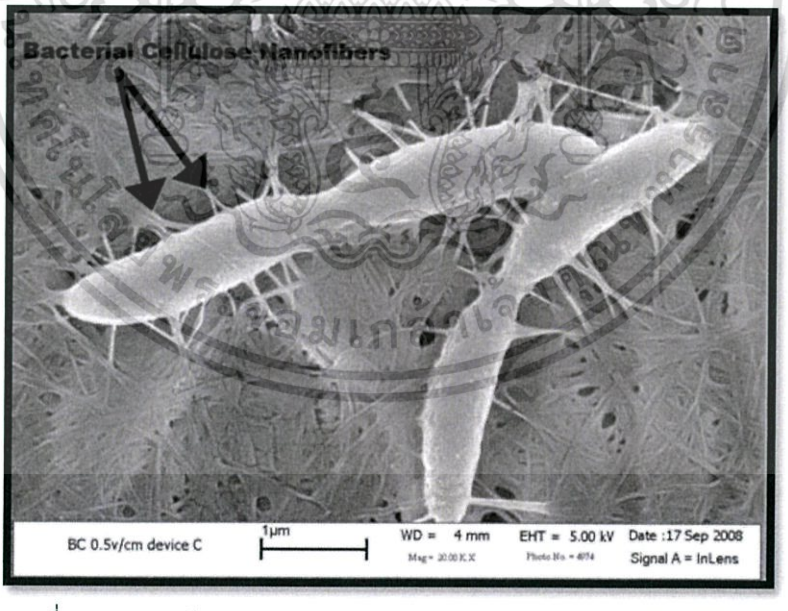
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2 แบคทีเรียที่สร้างเซลลูโลส

เซลลูโลสเป็นสารอินทรีย์โมเลกุลขนาดใหญ่ที่มีมาก และพบได้ในวัฏจักรคาร์บอน พืชชั้นสูงมีการสังเคราะห์เซลลูโลสในการเจริญเติบโตและการพัฒนาของเซลล์เช่นเดียวกับแบคทีเรีย บางชนิดที่สามารถผลิตเซลลูโลสได้เช่น *Acetobacter, Rhizobium, Agrobacterium* และ *Sarcina* โดยแบคทีเรียที่รู้จักกันมากที่สุดได่ *A. xylinum*

2.2.2.1 *Acetobacter xylinum*

A. xylinum เป็นแบคทีเรียวงศ์ *Acetobacteraceae* แกรมลบ (gram-negative) มีรูปร่างเป็นรูปไข่ (ellipsoidal) ถึงรูปแท่ง (rod) อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว เซลล์คู่ หรือเรียงต่อกันเป็นสาย ต้องการอากาศในการเจริญ (obligate aerobe) สามารถผลิตกรดอะซิติก (acetic acid) (Yamada และคณะ, 1997) เจริญได้ที่สภาวะ pH 3-7 อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโต (Verschuren และคณะ, 1999) เป็นแบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์เซลลูโลสออกมาภายนอกเซลล์ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากเมแทบอลิซึมปฐมภูมิ (Bielecki และคณะ, 2002) และมีประโยชน์เป็นอย่างมากในการผลิตเซลลูโลสในเชิงอุตสาหกรรม



รูปที่ 2.4 แสดงลักษณะของ *Acetobacter xylinum*
ที่มา : http://www.vtnews.vt.edu/articles/2008/11/2008-693.html
(14 ธันวาคม 2558)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2.2 การสังเคราะห์เซลลูโลส

การสังเคราะห์เซลลูโลสจากสารตั้งต้น มีกระบวนการผลิตที่ซับซ้อนหลายขั้นตอน ซึ่งเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ตัวเร่งปฏิกิริยาและโปรตีนควบคุมเป็นจำนวนมาก การสังเคราะห์เซลลูโลสของ *A. xylinum* โดยมีลักษณะแสดงดังภาพ 2.4 จัดเป็นกระบวนการเมแทบอลิซึมขั้นสุดท้ายของการใช้ประโยชน์จากคาร์บอน โดยเกี่ยวของกับ pentose phosphate cycle หรือ Krebs'cycle ควบคู่ไปกับกระบวนการ gluconeogenesis แบคทีเรียดังกล่าว จัดเป็นแบคทีเรียกรดอะซิติก (acetic acid bacteria) จึงไม่มีกระบวนการ glycolysis เนื่องจากไม่สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ phosphofructose kinase (Ross และคณะ, 1991)

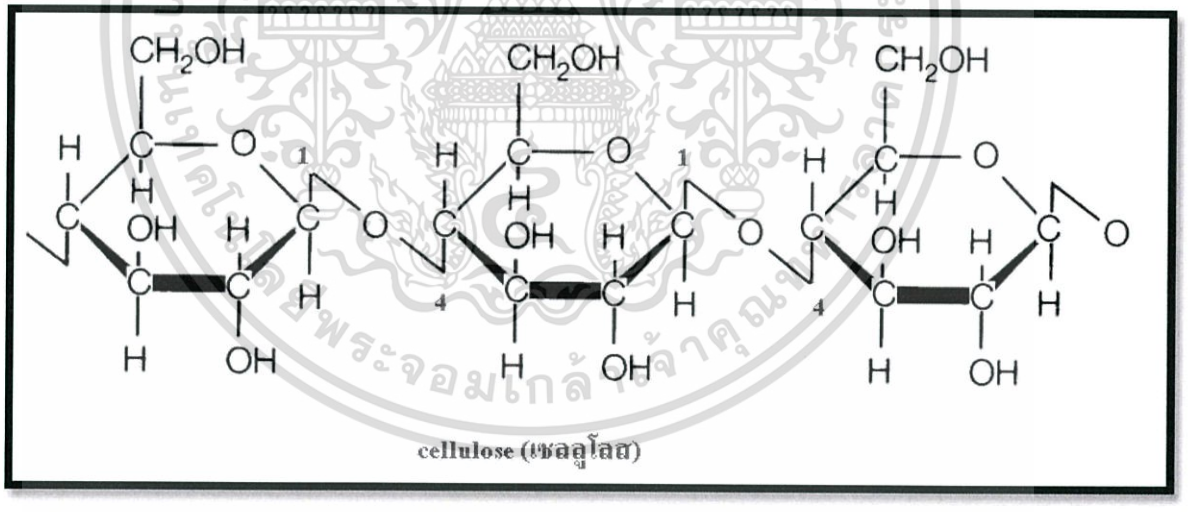
A. xylinum สามารถเปลี่ยนองค์ประกอบของแหล่งคาร์บอนต่างๆ ได้แก่ hexoses, glycerol, dihydroxy acetone, pyruvate และ dicarboxylic acids ไปเป็นเซลลูโลส โดยสารประกอบต่างๆ จะเข้าสู่ Krebs'cycle ในช่วงของ oxaloacetate decarboxylation ไปเป็น pyruvate คือเปลี่ยน hexoses ในกระบวนการ gluconeogenesis เช่นเดียวกับแหล่งคาร์บอนตัวอื่น สารตั้งต้นของการผลิตเซลลูโลสโดยตรงคือ UDPGlc เป็นผลิตภัณฑ์เดิมของวิถีการผลิตนี้ ซึ่งจะมีในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดรวมทั้งพืชด้วย และเกี่ยวข้องกับกระบวนการ glucose phosphorylation เปลี่ยนไปเป็น glucose-6-phosphate (Glc-6-P) โดยเอนไซม์ glucokinase ตามด้วย isomerizaion ของสารตัวกลางไปเป็น glc-α-1-P โดยเอนไซม์ phosphoglucomutase และเปลี่ยนไปเป็น UDPGlc โดยเอนไซม์ตัวสุดทายนี้คือ UDPGlc pyrophosphorylase ซึ่งเป็นตัวสำคัญในการสังเคราะห์เซลลูโลสและเซลลูโลสถูกปล่อยสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ โดยจะมีลักษณะเป็นเส้นใยเจริญอยู่บริเวณผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ (Saxena และคณะ, 1989) สภาวะการเลี้ยงในอาหารแบบนิ่ง *A. xylinum* จะสังเคราะห์เซลลูโลสที่มีลักษณะเป็นแผ่นหนาเจริญปกคลุมผิวอาหาร โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลสแสดงดังภาพ 2.6 การเลี้ยงในสภาวะอาหารที่มีการเขย่าจะมีการสังเคราะห์เซลลูโลสออกมาอยู่ในรูปก้อนกลม (Williams และ Cannon, 1989)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.5 แสดงลักษณะของเส้นใยและแผ่นเซลลูโลสที่แบคทีเรียสร้างขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ที่มา : http://www.hive76.org/category/green-tech/microbial-cellulose

(14 ธันวาคม 2558)



รูปที่ 2.6 แสดงโครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส

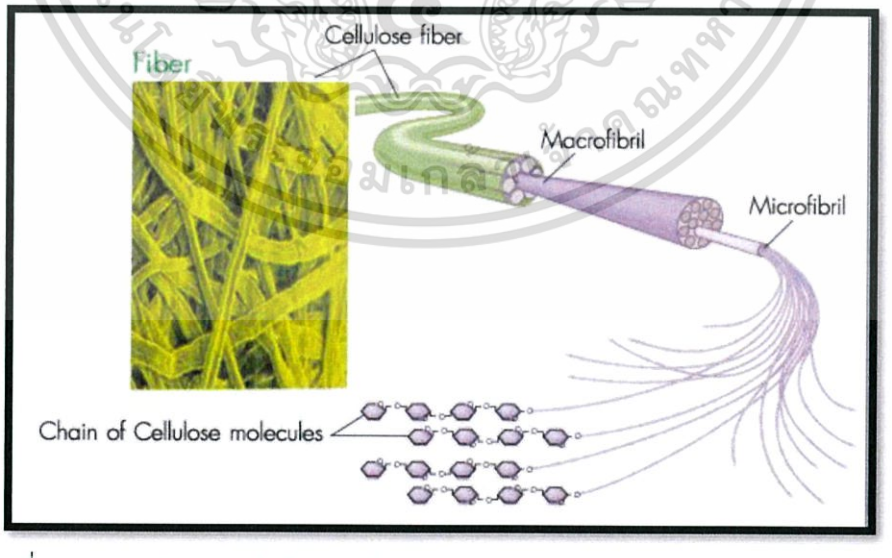
ที่มา : http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/0612/cellulose-เซลลูโลส

(14 ธันวาคม 2558)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2.3 การประยุกต์ทางอาหาร

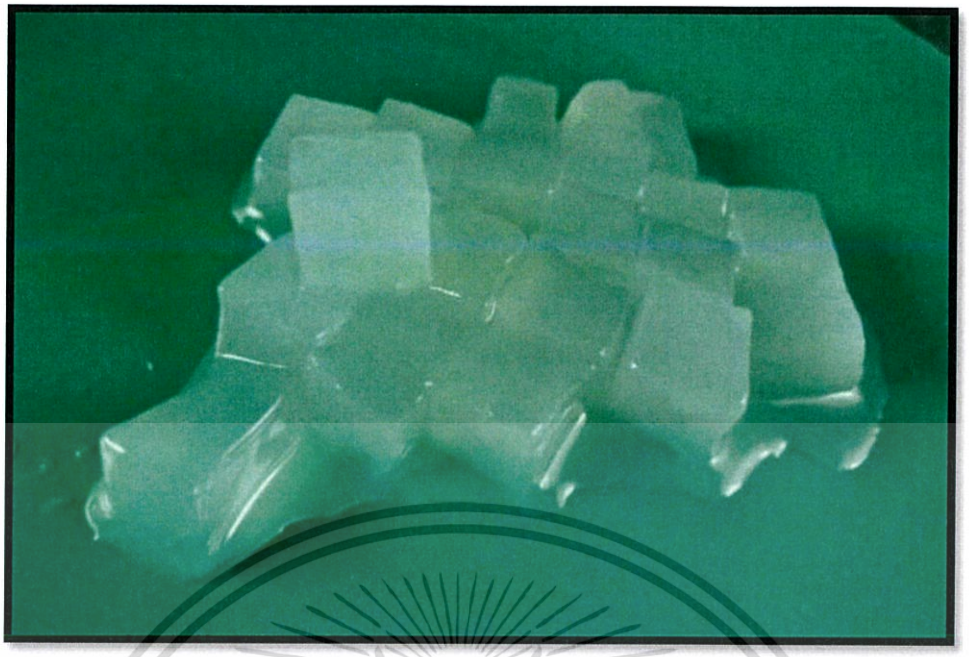
ได้มีการนำเซลลูโลสแบคทีเรียมาทำเป็นผลิตภัณฑ์อาหารในระดับการค้า ได้แก่ วุ้นมะพร้าว (nata de coco) แสดงดังภาพที่ 2.8 ซึ่งเป็นอาหารว่างพื้นบ้านของชาวฟิลิปปินส์ โดยผลิตได้จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในน้ำมะพร้าว และน้ำตาลซูโครส ทำให้ได้แผ่นวุ้นเซลลูโลส แสดงดังภาพที่ 2.5 โดยผู้บริโภคเชื่อกันว่าการกินวุ้นมะพร้าว จะช่วยต้านการเกิดมะเร็งในลำไส้ โรคเครียด โรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน และป้องกันการเพิ่มปริมาณน้ำตาลในปัสสาวะ ดังนั้นวุ้นมะพร้าวจึงได้รับความนิยมในการบริโภคเพิ่มขึ้น (Sutherland, 1988) จีนได้ผลิตอาหารที่มีเซลลูโลสแบคทีเรียเป็นส่วนประกอบขึ้นเรียกว่าชาเห็ด (tea kvassor tea-fungus) ดังภาพที่ 2.9 โดยได้จากการเลี้ยงเชื้อยีสต์และแบคทีเรียกรดอะซิติกในชา ที่มีส่วนประกอบของน้ำตาล ซึ่งจะเกิดเซลลูโลสบนผิวหน้า และเอนไซม์ที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพของผู้บริโภค โดยกิจกรรมของจุลินทรีย์และชา จะจำเพาะเจาะจงไปกระตุ้นส่วนของลำไส้เพื่อป้องกันการเกิดมะเร็งในลำไส้ (Lguchi และคณะ, 2000) นอกจากนี้มีการศึกษาการนำแผ่นเซลลูโลสแบคทีเรียที่สังเคราะห์ได้จากเชื้อ *A. xylinum* มาประยุกต์ใช้ในการผลิตไวน์และน้ำผลไม้โดยใช้เป็นตัวกรองและตัวตรึงสาร polyphenols ได้เป็นผลสำเร็จ (Krystynowicz และคณะ, 1999) ได้มีการผลิต anthocyanins เป็นตัวกระตุ้นทางชีวภาพในอาหารควบคุมน้ำหนักจำพวกเส้นใย โดยนำมาใช้ในการผลิตอาหารเพื่อสุขภาพได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้เซลลูโลสแบคทีเรียยังสามารถนำมาใช้เป็นส่วนประกอบของเบเกอรี่ที่มีบทบาทในเรื่องของเส้นใย รสชาติ กลิ่น รวมไปถึงยืดอายุในการเก็บรักษาได้เป็นอย่างดีด้วย



รูปที่ 2.7 แสดงลักษณะเส้นใยเซลลูโลส

ที่มา : http://www.myfirstbrain.com/student_view.aspx?ID=48389 (14 ธันวาคม 2558)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.8 แสดงวุ้นมะพร้าว

ที่มา : http://www.galamedianews.com/nasional/17135/bpom-nata-de-coco-diolah-za-dan-urea-food-grade-aman-dikonsumsi.html (14 ธันวาคม 2558)

รูปที่ 2.9 แสดงชาเห็ด หรือ tea kvassor tea-fungus

ที่มา : http://www.theholisticingredient.com/blogs/wholesome-living/10218221-kombucha-tea-the-why-the-how-and-the-where-do-you-grab-your-scoby และ http://www.splendidtable.org/story/how-to-make-kombucha-the-mother-of-fermented-drinks (14 ธันวาคม 2558)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3 ยีสต์ (นงลักษณ์ และ ปรีชา, 2552)

ยีสต์ หมายถึง ราที่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว อยู่ในอาณาจักรฟังไจ (fungi) ซึ่งเป็นอาณาจักรเดียวกับรา (mold) ยีสต์เป็นเซลล์ชนิดยูคาริโอต (Eukaryote) เป็นเซลล์เดี่ยวรูปร่างกลม รูปไข่ หรือเหมือนผลเถมอน มีขนาดใหญ่กว่าแบคทีเรีย (bacteria) ความกว้างของยีสต์มีขนาดที่แตกต่างกันตั้งแต่ 1-5 ไมโครเมตร และความยาว 5-30 ไมโครเมตร หรือมากกว่า มักมีรูปไข่ แต่บางชนิดมีรูปร่างยาวแต่บางชนิดมีรูปร่างกลม และส่วนมากสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศด้วยการแตกหน่อ (budding) ยีสต์บางชนิดอาจสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ด้วยการสร้างสปอร์ ซึ่งมีชื่อเรียกว่า แอสโคสปอร์ (ascospore) หรือ เบสิดิโอสปอร์ (basidiospore) ยีสต์พวกที่ชอบแรงดันออสโมซิสสูง สามารถเจริญอยู่ในที่ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลหรือเกลือสูงๆ และมีความชื้นจำกัด โดยทั่วไปยีสต์เจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่เป็นกรดระหว่างพีเอช 3.5 ถึง 3.8 ซึ่งจะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียส่วนใหญ่

ยีสต์มีลักษณะเป็นเซลล์เดียว จึงเจริญและสืบพันธุ์ได้เร็วกว่าเชื้อราเป็นเส้นสาย และมีการเปลี่ยนแปลงทางเคมีได้ดีกว่า มีอัตราส่วนของพื้นที่ผิวต่อปริมาตรสูงกว่า ยีสต์ต่างจากสาหร่ายเนื่องจากยีสต์ไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้และไม่เหมือนโพรโทซัว เพราะมีผนังเซลล์ที่แข็งแรง นอกจากนี้ยังแตกต่างไปจากแบคทีเรียส่วนใหญ่ เพราะมีขนาดใหญ่กว่าและลักษณะสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกัน ยีสต์พบทั่วไปในธรรมชาติ และแพร่กระจายไปโดยอาศัยแมลงและกระแสลมพาไป ส่วนใหญ่เป็นแซโพรไฟต์อาศัยอยู่บนสารอินทรีย์ที่ตายแล้ว บางชนิดเป็นปรสิตอาศัยโฮสต์ที่มีชีวิตและทำให้เกิดโรคแก่คน สัตว์ พืชได้ ยีสต์หลายชนิดพบอยู่ในดิน ชนิดของยีสต์ในดินสัมพันธ์กับแหล่งที่อยู่ของเชื้อ ความสามารถที่จะอยู่รอดในธรรมชาติ องค์ประกอบของดิน อุณหภูมิ แสงแดด ความชื้นและปัจจัยอื่นๆ สามารถพบยีสต์ได้ในดินที่ว่างเปล่าหรือดินที่มีการเพาะปลูกเช่น ป่า สวน ทุ่งหญ้า

2.2.3.1 ชนิดของยีสต์

ยีสต์ที่ขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศอย่างเดียวเรียกว่า ดิวเทอโรไมซีส หรือยีสต์เทียม ยีสต์ที่ขยายพันธุ์ได้ทั้งแบบไม่อาศัยเพศก็ได้ และอาศัยเพศโดยการสร้างแอสโคสปอร์เป็นยีสต์แท้ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม แอสโคไมซีส (ascomycete) ได้แก่ *Saccharomyces* ยีสต์เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน ยีสต์ที่เจริญได้ในภาวะที่มีออกซิเจนเรียกว่า ออกซิเดทีฟยีสต์ (oxidative yeast) โดยเกิดเป็นฟิมส์ที่ผิวหน้าของอาหารเหลว ส่วนยีสต์ที่เจริญได้ทั้งภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน เจริญได้ทุกส่วนของอาหารจัดเป็นพวกยีสต์เฟอร์เมนเตทีฟ (fermentative yeast)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3.2 ความสำคัญของยีสต์ต่ออาหาร

ยีสต์สายพันธุ์ที่ใช้มากในอาหาร คือ *Saccharomyces cerevisae* โดยยีสต์ใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอน เจริญได้ดีในอาหารที่มีน้ำตาลมาก เช่น ผลไม้ที่มีรสหวาน น้ำผึ้ง แยม (jam) สามารถเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็น คาร์บอนไดออกไซด์และเอทิลแอลกอฮอล์ในกระบวนการหมัก (fermentation)

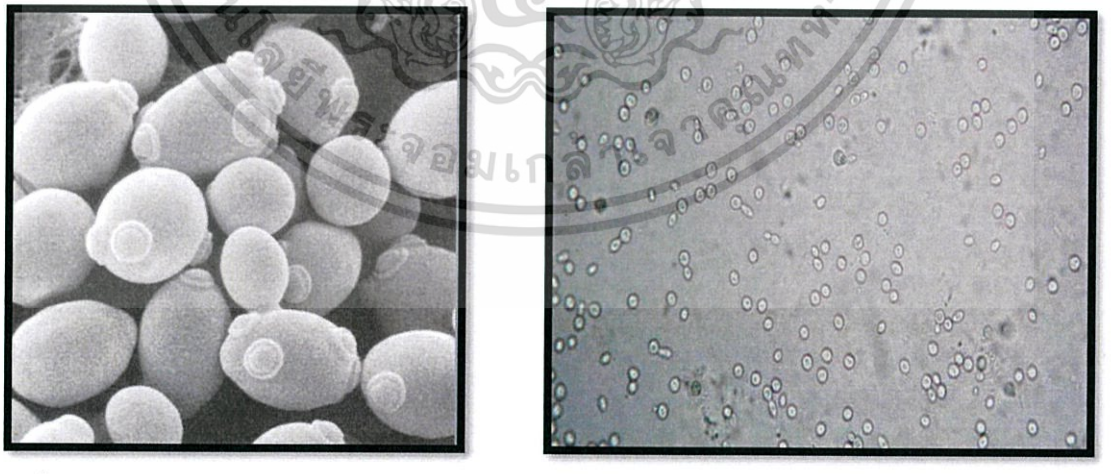
ใช้ในอุตสาหกรรมเบเกอรี่ (bakery) เรียกว่า baker yeast โดยใช้ เป็นสารที่ทำให้ขึ้นฟู (leavening agent) ในขนมปัง (bread) โดนัท (doughnut) ใช้ในรูป ยีสต์สด หรือ ยีสต์แห้ง (active dried yeast)

ใช้เพื่อการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ (alcoholic beverage) เช่น เบียร์ (beer) ไวน์ (wine) วิสกี้ (wiski) สาโท กระแช่

เซลล์ยีสต์มาผลิตเป็น ยีสต์สกัด (yeast extract หรือ yeast autolysate)

2.2.3.3 *Saccharomyces cerevisiae*

เซลล์รูปกลม รูปรี ทรงกระบอกหรือยาว ดังรูปที่ 2.10 สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยการแตกหน่อรอบเซลล์ อาจสร้างซูโดไมซิเลียม แต่ไม่พบไมซิเลียมจริง สร้างแอสโคสปอร์รูปกลมหรือรูปไข่ ส่วนผนังเรียบ มีบางชนิดที่ผนังสปอร์อาจมีปุ่ม โดยปกติมีจำนวน 1-4 สปอร์ต่อแอสคัส สปอร์หลุดออกจากแอสคัสได้ยาก ทุกชนิดหมักได้รวดเร็ว ไม่ใช้ไนเตรต



รูปที่ 2.10 แสดงลักษณะเซลล์ของ *Saccharomyces cerevisiae*

ที่มา : http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1509/saccharomyces-cerevisiae และ http://home.kku.ac.th/pracha/Yeast%20Culture.htm (14 ธันวาคม 2558)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3.4 การใช้ *Saccharomyces cereviae* ในอาหาร

ใช้ในการหมัก (fermentation) ให้ได้ผลผลิตหลักคือเอทิลแอลกอฮอล์ ยีสต์ชนิดนี้จะเปลี่ยน น้ำตาลให้เป็นเอทิลแอลกอฮอล์และคาร์บอนไดออกไซด์ ใช้ในการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ หลายชนิดได้แก่

- เบียร์ (beer) ซึ่งอาจเรียกว่า Brewer's yeast ใช้ผลิตเบียร์ชนิด เอล (Ale) อาจเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Ale yeast มีลักษณะพิเศษคือ ผลิตแอลกอฮอล์สูง ที่อุณหภูมิ 16 ถึง 24 องศาเซลเซียส หลังจากการหมัก เซลล์ยีสต์ลอยตัวเป็นกลุ่มอยู่ที่ผิวหน้าของเบียร์ ทำให้เรียกได้อีกชื่อว่า Top-fermenting yeast หรือ top yeast หรือ surface yeast

- ไวน์ (wine) สาเก (sake) ปรั่นดี (brandy) วิสกี้ (whiskey) รัม (rum)

- *S. cerevisiae* อาจใช้ร่วมกับจุลินทรีย์อื่น เช่น แบคทีเรีย รา เพื่อการหมักอาหารโปรตีน เช่น อาหารหมักจากถั่วเหลือง ให้ได้กลิ่นหอมของแอลกอฮอล์ เช่น การหมักซีอิ้วแบบหมัก (fermented soy sauce)

2.3 ปฏิกิริยาการเกิดชาหมัก

การดำเนินกิจกรรมการหมักของแบคทีเรียและยีสต์ จะเป็นแบบพึ่งพาอาศัยกันในลักษณะเอื้อประโยชน์ต่อกันหรือเรียกว่า stable symbiosis โดยเกิดขึ้นภายใต้โครงสร้างบริเวณที่มีลักษณะเป็นร่างแหเซลลูโลส กิจกรรมการหมักในระยะแรกยีสต์จะทำหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาลซูโครสให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว คือ กลูโคส และฟรุกโตส จากนั้นก็จะเปลี่ยนน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวให้เป็นแอลกอฮอล์ ทำให้สภาวะดังกล่าวมีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกลุ่มแบคทีเรีย *Acetobacter* ที่สามารถเจริญได้ดีพร้อมทั้งผลิตกรดอะซิติก โดยเฉพาะการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Acetobacter xylinum* ที่สามารถให้ทั้งผลผลิตของกรดอะซิติก กรดกลูโคนิคและเซลลูโลส ทำให้ชาหมักที่ได้มีคุณภาพดี ปริมาณกรดอะซิติกที่เพิ่มขึ้น จะแปรผกผันกับค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายที่ลดลง ขณะเดียวกันก็จะส่งผลต่อการเร่งการเจริญเติบโตของยีสต์ ทำให้ยีสต์ผลิตแอลกอฮอล์ได้มากขึ้น ปริมาณแอลกอฮอล์ที่เพิ่มขึ้นยังสามารถช่วยกระตุ้นให้ *Acetobacter* เจริญและผลิตกรดอะซิติกได้ดีขึ้นเช่นกัน การที่แบคทีเรีย *Acetobacter* สามารถออกซิไดซ์แอลกอฮอล์ไปเป็น acetaldehyde และสารให้กลิ่นรสอื่นๆ เป็นผลให้ชาหมักมีปริมาณแอลกอฮอล์ไม่สูงมากนักเมื่อเทียบกับเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ทั่วไป ปกติเครื่องดื่มชาหมักมีปริมาณแอลกอฮอล์ไม่เกิน 10 กรัมต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ลิตร ส่วนปริมาณกรดทั้งหมดมีค่าน้อยกว่า 30 กรัมต่อลิตรหรือประมาณร้อยละ 3 กรดที่พบในชาหมัก ได้แก่ อะซิติก แลคติก และกลูโคนิค

การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลให้เป็นเอทิลแอลกอฮอล์โดยอาศัยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ภายใต้สภาพไร้อากาศ สำหรับปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นดังนี้

$$C_6H_{12}C_6 \longrightarrow 2CO_2 + 2C_2H_5OH$$

กลูโคส แอลกอฮอล์

ในระหว่างการเปลี่ยนแปลงจากกลูโคสเป็นแอลกอฮอล์มีขั้นตอนเกิดขึ้นเป็นลำดับหลายขั้นตอน และยังมีผลิตภัณฑ์ชนิดอื่นๆ ผลิตออกมา แต่ในปริมาณเล็กน้อยเท่านั้น เช่น กลีเซอรอล กรดแอซีติก และเอมิลแอลกอฮอล์ (amyl alcohol) เป็นต้น การเปลี่ยนแปลงแอลกอฮอล์ให้เป็นกรดแอซีติกโดยปฏิกิริยาออกซิเดชัน เป็นปฏิกิริยาต้องการอากาศ และอาศัยแบคทีเรียที่สร้างกรดแอซีติกดังปฏิกิริยาดังนี้

$$C_2H_5OH + O_2 \longrightarrow CH_3COOH + H_2O$$

แอลกอฮอล์ ออกซิเจน กรดอะซีติก น้ำ

นอกจากกรดอะซิติก ผลิตภัณฑ์อื่นก็ถูกผลิตออกมาด้วย เช่น อัลดีไฮด์ เอสเทอร์ เป็นต้น แต่มีปริมาณเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (http://202.28.24.44/e_books/602122/E-learning%20WORD/%BA%B7%B7%D5%E8%203%20%BA%B7%BA%D2%B7%A8%D8%C5%D4%B9%B7%C3%D5%C2%EC.doc, http://yaamata.blogspot.com/2011/10/kombucha.html, 11 ตุลาคม 2558)

2.4 อนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ คือ อะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็คตรอนไม่เป็นคู่ อยู่ในวงอิเล็คตรอนวงนอกสุด (outer orbital) ของอะตอมหรือโมเลกุล เนื่องจากการมีอิเล็กตรอนที่โดดเดี่ยว (unpaired electron) อยู่ในวงโคจรของโมเลกุลทำให้ไม่เสถียร ทำให้อนุมูลอิสระเป็นสารที่มีความไวในการเข้าทำปฏิกิริยาทางเคมีกับสารอื่นสูงมาก โดยอนุมูลอิสระจะไปแย่งจับหรือดึงเอาอิเล็กตรอนจากโมเลกุลหรืออะตอมสารที่อยู่ข้างเคียงเพื่อให้ตัวมันเสถียร โมเลกุลที่อยู่ข้างเคียงที่สูญเสียหรือรับอิเล็กตรอนจะกลายเป็นอนุมูลอิสระชนิดใหม่ ซึ่งอนุมูลอิสระที่เกิดมาใหม่นี้จะไปทำปฏิกิริยากับสารโมเลกุลอื่นต่อไป เกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain reaction) ต่อกันไปเรื่อยๆ (Halliwell, 1991) ในขณะเดียวกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
149057

ก็ชักนำสารที่ให้อิเล็กตรอนไปแล้วนั้นมีอิเล็กตรอนไม่ครบคู่ จนอาจกลายเป็นสารที่มีความรุนแรง โดยที่อนุมูลอิสระก็มีสมบัติเหมือนสารทั่วๆไป ตรงที่ความสามารถในการเข้าทำปฏิกิริยากับสารอื่นสามารถเปลี่ยนแปลงได้ตามอุณหภูมิ ความเป็นกรดด่าง (pH) และความชื้น เป็นต้น ซึ่งถ้าเกิดขึ้นในระบบสิ่งมีชีวิต อาจทำอันตรายกับส่วนประกอบสำคัญของเซลล์รอบๆ ไม่ว่าจะเป็นโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต หรือดีเอ็นเอ ทำให้สารชีวโมเลกุลเหล่านี้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและเสียหน้าที่การทำงาน ดังนั้นในสภาวะที่มีการสร้างอนุมูลอิสระเป็นจำนวนมากจะก่อให้เกิดการบาดเจ็บของเซลล์ ซึ่งเป็นกลไกสำคัญที่ก่อให้เกิดพยาธิสภาพต่างๆได้ เช่น โรคมะเร็ง โรคหลอดเลือดหัวใจ โรค Parkinson โรค Alzheimer ไขข้ออักเสบ และต้อกระจก เป็นต้น (Ames และคณะ, 1993)

อนุมูลอิสระมีทั้งที่อยู่ในสภาวะที่เป็นกลางทางไฟฟ้า และอนุมูลในสภาวะที่มีประจุไฟฟ้า โดยมีทั้ง ประจุบวกและประจุลบ สัญลักษณ์ทางเคมีของอนุมูลอิสระ คือ อิเล็กตรอนเดี่ยวของอนุมูลอิสระจะแสดงด้วยจุดในตำแหน่งข้างบนของสัญลักษณ์ทางเคมี เช่น อนุมูล $R^{\bullet}$ แทนอะตอมหรือโมเลกุลของอนุมูลอิสระที่ไม่จำเพาะเจาะจง ซึ่งอนุมูลอิสระมีทั้งที่เป็นประจุบวก ($R^{+\bullet}$) เช่น อนุมูล pyridinyl ($NAD^{+\bullet}$) และประจุลบ ($R^{-\bullet}$) เช่น อนุมูล superoxide ($O_2^{-\bullet}$) หรือเป็นกลาง เช่น อนุมูล peroxyl ($ROO^{\bullet}$) หรืออนุมูล thiyl ($RS^{\bullet}$) เป็นต้น ซึ่งจากคำจำกัดความนี้ส่งผลให้อะตอมของธาตุและสารละลายหลายชนิดถูกจัดเป็นอนุมูลอิสระด้วย เช่น คลอรีนอะตอม ($Cl^{\bullet}$) และซิลเวอร์อะตอม ($Ag^{\bullet}$) เป็นต้น อนุมูลอิสระที่มีความสำคัญในทางชีวภาพ ได้แก่ Hydroxyl radical ($HO^{\bullet}$), Superoxide anion radical ($O_2^{-\bullet}$) เป็นต้น อนุมูลเหล่านี้จัดเป็นอนุมูลที่ไวในการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีกับสารอื่นสูงมาก

2.4.1 แหล่งกำเนิดอนุมูลอิสระ

ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดที่ใช้ออกซิเจนในการดำรงชีพ จะมีอนุมูลอิสระของออกซิเจนเกิดขึ้นอยู่ตลอดเวลา การเกิดอนุมูลอิสระเหล่านี้ มีสาเหตุมาจากปัจจัยทั้งภายในและภายนอกร่างกาย ดังนี้

2.4.1.1 ปัจจัยภายในร่างกาย ในร่างกายของสิ่งมีชีวิตจะมีปฏิกิริยามากมาย ที่เกี่ยวข้องกันทั้งการสร้างและการสลายโมเลกุลของสาร ที่เรียกว่ากระบวนการเมแทบอลิซึม ซึ่งถือเป็นสาเหตุหลักอย่างหนึ่งที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ ตัวอย่างเช่น ในกระบวนการหายใจจะเกิดออกซิเจนที่มีประจุลบ ซึ่งก็คืออนุมูลอิสระ สารตัวนี้สามารถรวมตัวกับไขมัน LDL (Low Density Lipoproteins) ได้ดี และยังสามารถรวมตัวกับสารบางชนิดในร่างกายก่อให้เกิดสารพิษที่ทำลายเนื้อเยื่อ หรืออาจไปเปลี่ยนแปลงข้อมูลทางพันธุกรรมในดีเอ็นเอ ทำให้เซลล์ปกติเปลี่ยนสภาพไปเป็นเซลล์มะเร็ง เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.1.2 ปัจจัยภายนอกร่างกาย

ยารักษาโรค ยาบางชนิดที่รับประทานเข้าไปในร่างกายสามารถก่อให้เกิดอนุมูลอิสระได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งยาในกลุ่มต้านจุลชีพและต้านมะเร็ง เช่น บลีโอไมซิน (bleomycin) แอนทราไซคลินส์ (anthracyclines) (Voest และคณะ, 1994) และ เมโธทรีเสต (methotrexate) (Gressier และคณะ, 1994) เนื่องจากมีฤทธิ์เสริมปฏิกิริยาออกซิเดชัน (prooxidation)

รังสี การใช้รังสีรักษาโรค เช่น รังสีเอกซ์ (X-ray) รังสีแกมมา (γ-ray) อาจเป็นสาเหตุทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นในร่างกายจากการถ่ายทอดพลังงานให้กับน้ำ ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเซลล์แล้วก่อให้เกิดปฏิกิริยาขั้นต่อไป (secondary reaction) กับออกซิเจนที่ละลายอยู่ในเซลล์นั้น ได้อนุมูลอิสระเกิดขึ้น (Halliwell และคณะ, 1995)

ควันบุหรี่ ในควันบุหรี่มีส่วนประกอบของไนตริกออกไซด์ (NO) ไนโตรเจนออกไซด์ (NO_2) และเพอรอกซีไนไตรท์ ($ONOO^-$) รวมทั้งสารมลพิษ ได้แก่ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO_2) และคาร์บอนเตรตตะคลอไรด์ (CCl_4) ซึ่งจะถูกกำจัดออกจากร่างกายโดยการทำงานของเอนไซม์ ไซโทโครม P-450 ไฮดรอกซีเลส (cytochrome P-450 hydroxylase) ที่มีอยู่มากในเซลล์ตับและพบได้บ้างในเซลล์ปอดและลำไส้เล็ก ทำให้เป็นสาเหตุของการสร้างอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ภายในเซลล์ดังกล่าว (Bast และคณะ, 1991)

โอโซน โอโซนไม่ได้เป็นอนุมูลอิสระแต่จัดเป็น สารออกซิไดส์แรงสูงซึ่งสามารถเปลี่ยนรูปเป็นอนุมูลไฮดรอกซิลได้จากการกระตุ้นของคลื่นแสง (Valacchi และคณะ, 2004)

การได้รับเชื้อโรค เช่นการติดเชื้อไวรัสหรือเชื้อแบคทีเรีย

โรคเกี่ยวกับภูมิคุ้มกัน (Autoimmune Diseases) เช่น ข้ออักเสบ รูมาตอยด์

กระบวนการประกอบอาหารเช่น การย่างเนื้อสัตว์ ที่มีส่วนประกอบของไขมันสูง การนำน้ำมันที่ใช้ทอดอาหารที่มีอุณหภูมิสูงๆกลับมาใช้อีก ทำให้เกิดอาหารประเภทเกรียมไหม้ หรือเกิดจากการปิ้ง ย่าง

2.5 สารต้านอนุมูลอิสระ

2.5.1 ความหมายของสารต้านอนุมูลอิสระ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารต้านออกซิเดชัน (antioxidant) คือ สารที่ทำหน้าที่ยับยั้งหรือต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือสารที่สามารถขจัดอนุมูลอิสระออกจากร่างกาย ร่างกายมีระบบต้านออกซิเดชัน แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ ประเภทแรกป้องกันการเกิดสารอนุมูลอิสระ ได้แก่ เอนไซม์ superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase, peroxidase, cytochrome C peroxidase ทองแดง สังกะสี ซีเลเนียม โปรตีน ซึ่งมีทองแดงอยู่ในโมเลกุล (ceruloplasmin) ส่วนอีกประเภทหนึ่งคือ สารต้านออกซิเดชันในกลุ่มที่ทำลายปฏิกิริยาลูกโซ่นี้ ได้แก่ วิตามินอี เบต้า-แคโรทีน วิตามินซี ubiquinone, uric acid, bilirubin, albumin, sulfhydryl groups ในกรดอะมิโน cysteine ซึ่งมีอยู่ในโปรตีน เช่น เนื้อสัตว์ นอกจากสารเหล่านี้ ยังมีสารประกอบฟีโนลิก (phenolic compounds) และสารกลุ่ม flavanoids ที่เป็นสารต้านออกซิเดชันที่น่าสนใจอีกด้วย

- สารต้านอนุมูลอิสระช่วยไม่ให้พวกอนุมูลอิสระก่อตัวขึ้น สารต้านอนุมูลอิสระยังยับยั้งพวกโลหะ เช่น เหล็ก ซึ่งเป็นตัวเริ่มต้นในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ทำให้อนุมูลอิสระไม่มีโอกาสทำความเดือดร้อนให้ร่างกายได้

- สารต้านอนุมูลอิสระจะหยุดยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระโดยทำให้อนุมูลอิสระคงตัว และเป็นการหยุดการก่อตัวใหม่ของอนุมูลอิสระ

- สารต้านอนุมูลอิสระช่วยซ่อมแซมความเสียหายที่เกิดจากตัวอนุมูลอิสระทำลายเซลล์ต่างๆ ภายในร่างกาย

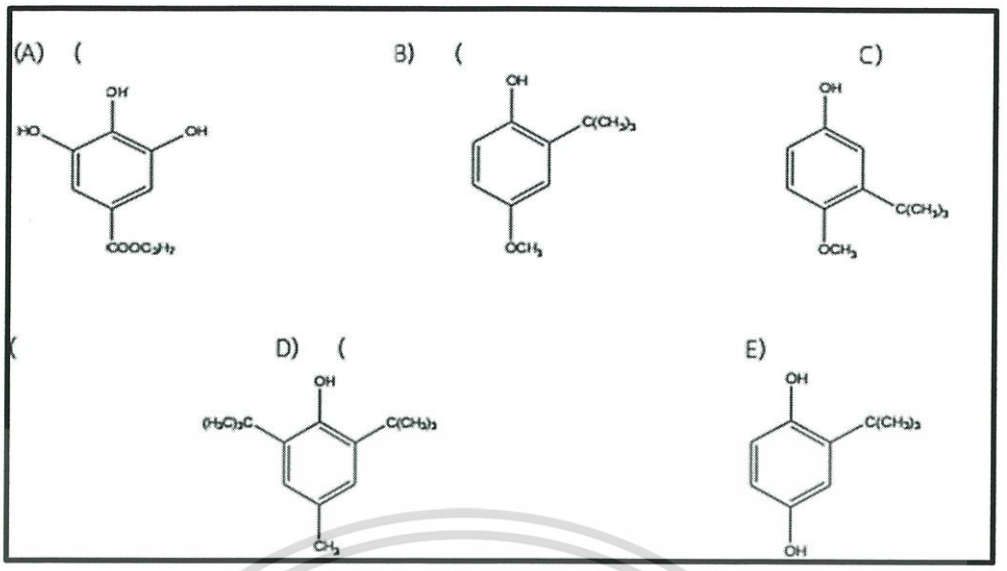
- สารต้านอนุมูลอิสระช่วยกำจัดและแทนที่โมเลกุลที่ถูกทำลาย เพราะสารเหล่านี้อาจเป็นพิษต่อร่างกาย

2.5.2 แหล่งที่มาของสารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระแบ่งตามแหล่งที่มาได้ 2 ชนิด ได้แก่

2.5.2.1 สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (Synthetic antioxidants) โดยสารประกอบฟีนอลิกสังเคราะห์ 5 ชนิด ได้แก่ 2-butylated hydroxyanisole, BHT (butylated hydroxytoluene), 3 - butylate hydroxyanisole, propyl gallate และ tertiary butyl hydroquinone มีสูตรโครงสร้างดังภาพประกอบ 2.11 เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันอันเป็นสาเหตุให้อาหารมีกลิ่น สี และรสชาติที่เปลี่ยนไป สารสังเคราะห์เหล่านี้มีประสิทธิภาพและความคงตัวสูงกว่าสารสกัดจากธรรมชาติ แต่มีข้อจำกัดของการใช้เนื่องจากปัญหาด้านความปลอดภัยในการบริโภค (Yang และคณะ, 2000; Pokorny และคณะ, 2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.11 แสดงโครงสร้างทางเคมีของสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (A) Propyl gallate, (B) 3-Butylated hydroxyanisole, (C) 2-Butylated hydroxyanisole, (D) Butylated hydroxytoluene, (E) Tertiary butyl hydroquinone

ที่มา : Howell and Saeed (1999)

2.5.2.2 สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (Natural antioxidants) สารกลุ่มนี้ได้รับความสนใจและมีการค้นคว้าอย่างมากในปัจจุบัน เนื่องจากความเชื่อมั่นว่ามีความปลอดภัยในการบริโภคมากกว่าสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ สารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้พบได้ทั้งในจุลชีพ สัตว์ และพืช ซึ่งมีทั้งที่เป็นวิตามิน เช่น วิตามินซี วิตามินอี เบต้าแคโรทีน และสารที่ไม่ให้คุณค่าทางโภชนาการ (nonnutrient) ซึ่งมีโครงสร้างเป็นสารประกอบฟีนอลิค โดยเฉพาะกลุ่มโพลีฟีนอล (polyphenols) เช่น แซนโธน (xanthone) และฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ซึ่งประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิลที่เกาะบนวงเบนซีน (aromatic hydroxyl) ตั้งแต่ 2 หมู่ขึ้นไป หมู่ฟังก์ชั่น (functional group) เหล่านี้ มีบทบาทสำคัญในการดักจับอนุมูลอิสระไม่ให้ไปกระตุ้นหรือก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ โดยการให้อนุมูล $H^{\cdot}$ แก่อนุมูลอิสระเหล่านั้น นอกจากนี้สารประกอบโพลีฟีนอลที่มีโครงสร้างของ ortho-dihydroxyl phenol อยู่ในโมเลกุลยังสามารถยับยั้งการเกิดอนุมูล $OH^{\cdot}$ ในปฏิกิริยาที่มีอนุมูลโลหะทรานซิชัน คือ Fe2+ และ Cu2+ เป็นตัวเหนี่ยวนำได้ โดยการเข้าจับกับโลหะ ดังกล่าวเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน (complex) (Sanchez-Moreno และคณะ, 2000)

2.5.3 ประเภทของสารต้านอนุมูลอิสระ

โดยทั่วไปสารต้านอนุมูลอิสระแบ่งเป็น 5 ประเภทใหญ่ ๆ ดังนี้ (อัญชนา, 2544)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.3.1 primary antioxidant สารในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่ ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิค (phenolic substance) ทำหน้าที่หยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระในปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน นอกจากนี้ยังรวมถึงสารโทโคฟีรอลธรรมชาติและสังเคราะห์ (natural and synthetic tocopherol) alkyl gallate, BHA, BHT, TBHQ และอื่นๆ ซึ่งสารในกลุ่มดังกล่าวทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอน

2.5.3.2 oxygen scavenger สารในกลุ่มนี้ ได้แก่ กรดแอสคอร์บิค หรือวิตามินซี ascorbyl, palmitate, erythorbic acid (isoascorbic acid) และ sodium erythorbate เป็นต้น สารในกลุ่มนี้จะเข้าทำปฏิกิริยากับออกซิเจน จึงเป็นการช่วยกำจัดออกซิเจนในระบบปิดได้

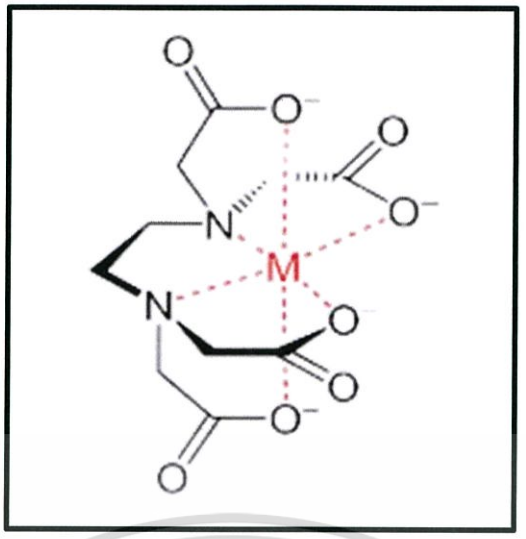
2.5.3.3 secondary antioxidant สารในกลุ่มนี้ ได้แก่ dilauryl thiopropionate และ thiopropionic acid ทำหน้าที่สลายโมเลกุลของ lipid hydroperoxide ให้เป็นสารที่มีความเสถียร

2.5.3.4 enzymic antioxidant สารในกลุ่มนี้ ได้แก่ เอนไซม์ต่างๆ ซึ่งแบ่งเป็น primary antioxidant enzyme และ ancillary antioxidant enzyme สารในกลุ่มนี้ทำหน้าที่กำจัดออกซิเจนหรืออนุพันธ์ของออกซิเจน โดยเฉพาะไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

2.5.3.5 chelating agent หรือ sequestrant สารในกลุ่มนี้ เช่น กรดซิตริค กรดอะมิโน ethylenediaminetetra-acetic acid (EDTA) เป็นต้น สารในกลุ่มนี้ทำหน้าที่ไปจับกับไอออนของโลหะ เช่น เหล็ก และทองแดง ซึ่งไอออนเหล่านี้เป็นไอออนที่ส่งเสริมและเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน ทำให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่เสถียรดังภาพที่ 2.12

(http://research.pcru.ac.th/rdb/ pro_data/files/5101023.pdf, 20 ตุลาคม 2558)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



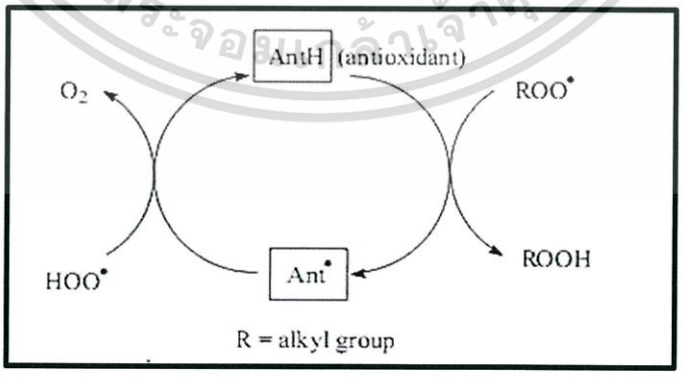
รูปที่ 2.12 แสดงโครงสร้างของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง EDTA กับโลหะไอออน

ที่มา : Brown (2006)

2.5.4 สารต้านอนุมูลอิสระบางชนิด

2.5.4.1 วิตามินเอ

วิตามินเอในรูปของเบต้าแคโรทีน (β-carotene) มีคุณสมบัติการละลายได้ดีในไขมัน ดังนั้นจึงสามารถเข้าไปออกฤทธิ์ในการหยุดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์ โดยมีกลไกเช่นเดียวกับวิตามินอี คือจะเป็นตัวให้อะตอมไฮโดรเจน (AntH) กับอนุมูลอิสระลิปิดเปอร์ออกซี (LOO•) และอนุมูลอัลคอกซิล (ROO•) จากนั้นเบต้าแคโรทีนจะถูกเปลี่ยนเป็นสารที่ไม่อันตรายต่อเซลล์ (Ant•) แสดงในภาพที่ 2.13 และขับออกจากร่างกาย (เสาวนีย์, 2542 ; นงนภัส, 2551)



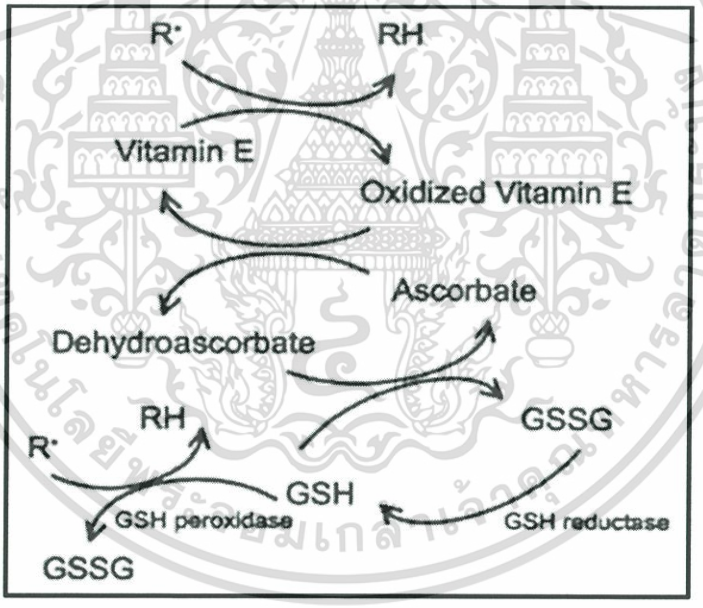
รูปที่ 2.13 แสดงกลไกการหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของสารต้านอนุมูลอิสระ

ที่มา : http://www.jbf.co.th/index.php/2012-11-13-08-45-03/81-antioxidant (20 ตุลาคม 2558)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.4.2 วิตามินซี

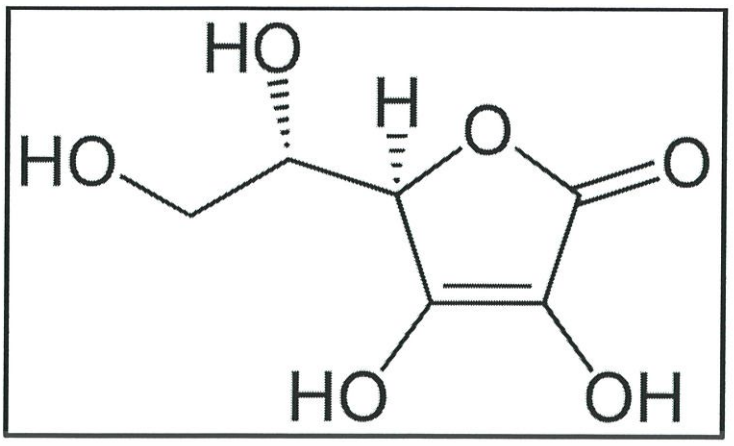
วิตามินซี มีบทบาทในการเข้ามาช่วยรีดิวซ์วิตามินอีให้กลับมาอยู่ในรูปเดิม โดยการให้ไฮโดรเจนอะตอมกับวิตามินอี ซึ่งส่งผลให้วิตามินอีกลับมามีประสิทธิภาพในการหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่อีกครั้ง กรดแอสคอร์บิกที่ผ่านการรีดิวซ์จะกลายเป็นกรดดีไฮโดรแอสคอร์บิกที่ไม่พร้อมทำงาน จากนั้น กลูตาไทโอนในร่างกายจะทำหน้าที่รีดิวซ์กรดดีไฮโดรแอสคอร์บิกให้กลับไปเป็นกรดแอสคอบิกที่พร้อมทำงานเช่นเดิม (Lauren, 2008) แสดงในภาพที่ 2.14 วิตามินซีมีคุณสมบัติในการละลายน้ำได้ดีจึงช่วยในการทำลายอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์เติมออกซิเจนก่อนที่จะเข้าจับเยื่อหุ้มเซลล์ เพื่อไม่ให้สารเหล่านี้เข้าทำลายเซลล์ รวมทั้งสารที่ผลิตออกมาขณะเกิดกระบวนการการจับกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytosis) และวิตามินซีมีความสามารถในการป้องกันการทำลายสภาพธรรมชาติ (denature) ของเซลล์ที่เกิดขึ้นจากสารก่อออกซิเดชันเหล่านั้น และมีบทบาทในระบบภูมิคุ้มกัน (Stankova และคณะ, 1975) โครงสร้างทางเคมีของวิตามินซีแสดงดังภาพ 2.15



รูปที่ 2.14 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างวิตามินอี วิตามินซีและกลูตาไทโอน

ที่มา : http://www.jbf.co.th/index.php/2012-11-13-08-45-03/81-antioxidant (20 ตุลาคม 2558)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.15 แสดงโครงสร้างทางเคมีของวิตามินซี

ที่มา : https://th.wikipedia.org/wiki/วิตามินซี (20 ตุลาคม 2558)

2.5.4.3 วิตามินอี

วิตามินอี (Vitamin E) เป็นวิตามินชนิดที่ละลายในไขมัน มีชื่อเรียกอีกอย่างว่า โทโคฟีรอล (tocopherol) จะถูกดูดซึมผ่านผนังลำไส้เล็กได้ต้องอาศัยพวกเกลือน้ำดีและไขมันช่วยในการดูดซึม ในร่างกายมักสะสมตามกล้ามเนื้อและเนื้อเยื่อไขมัน ส่วนเนื้อเยื่ออื่นๆจะมีวิตามินอีอยู่เพียงเล็กน้อย บทบาทที่สำคัญของวิตามินอี คือ เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ช่วยป้องกันภาวะหัวใจล้มเหลว รักษาสุขภาพของหัวใจ ป้องกันการเป็นหมัน กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง ลดความเสียหายจากภาวะโรคเบาหวาน ยับยั้งการทำลายสมองจากโรคอัลไซเมอร์

โครงสร้างโมเลกุลของวิตามินอีประกอบด้วยส่วนที่มีขั้วของวงแหวนโครแมน (chroman ring) เป็นส่วนหัวที่ซึ่งเป็นส่วนที่ออกฤทธิ์เป็น antioxidant และส่วนหางของ tocopherol เป็นหมู่ที่แทนที่ด้านข้างด้วยส่วนที่ไม่มีขั้วจากหมู่ phytyl group ในขณะที่ส่วนหางของ tocotrienol เป็น polyisosophenoid group ส่วนหางนี้ ทำหน้าที่ฝังตัว และยึดเหนี่ยวกับสารไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ และแกนของ lipoprotein แต่ละชนิดมีความแตกต่างกันที่จำนวน และตำแหน่งของหมู่เมทิล (methyl group, $-CH_3$) ในวงแหวนโครแมนตำแหน่งคาร์บอนที่ 5, 7 และ 8 แสดงดังภาพ 2.16

วิตามินอีมีหลายชนิด ปัจจุบันแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ โทโคฟีรอลและโทโคไทอินอล แต่ละกลุ่มยังแยกเป็นวิตามินย่อยๆ อีก 4 ชนิด ได้แก่ อัลฟา (α-) เบต้า (β-) แกมมา (γ-) และเดลต้า (δ-) วิตามินอี ทำหน้าที่เป็นตัวให้ไฮโดรเจนแก่อนุมูล peroxyl ดังสมการ

$$\alpha\text{- tocopherol} + LOO^{\bullet} \longrightarrow \alpha\text{- tocopherol}^{\bullet} + LOOH$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

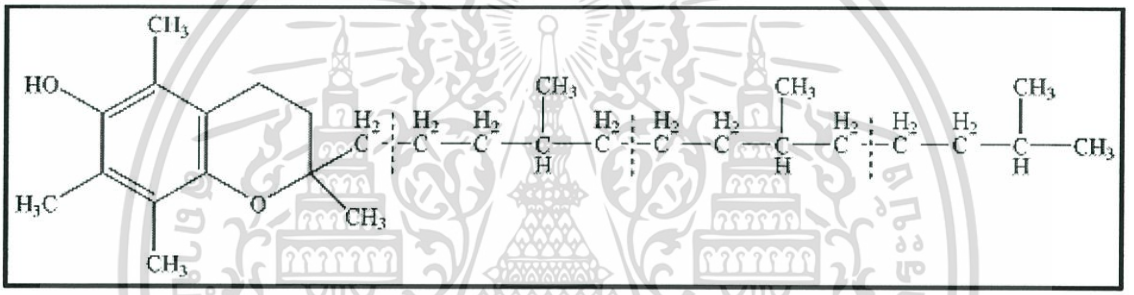
อนุมูล α- tocopherol• ที่เกิดขึ้นสามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูล peroxyl ตัวอื่นทำให้ได้สารที่มีความ เสถียร (LOO-α- tocopherol) ดังสมการ เป็นผลให้ปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันหยุดลง (Basu และคณะ, 1999)

α- tocopherol• + LOO• ⟶ LOO- α- tocopherol

อนุมูล α- tocopherol• ที่เกิดขึ้นสามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูล peroxyl ตัวอื่นทำให้ได้สารที่มีความ เสถียร (LOO-α- tocopherol) ดังสมการ เป็นผลให้ปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันหยุดลง (Basu และคณะ, 1999)

α- tocopherol• + LOO• ⟶ LOO- α- tocopherol

(http://antioxidantherb.blogspot.com/2011/07/vitamin-e.html และ http://archive.lib.cmu.ac.th/full/T/2551/biol0451tp_ch2.pdf, 20 ตุลาคม 2558)



ภาพที่ 2.16 แสดงโครงสร้างทางเคมีของวิตามินอี

ที่มา : http://www.siamchemi.com/วิตามินอี (20 ตุลาคม 2558)

2.5.5 สารประกอบฟีโนลิก (phenolic compounds)

สารประกอบฟีโนลิกเป็นสารที่พบได้ในพืชทั่วไป มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนที่มีหมู่ไฮดรอกซิลอย่างน้อยหนึ่งหมู่หรือมากกว่านั้น สามารถละลายน้ำได้ ที่พบในพืชมักจะรวมอยู่ในโมเลกุลของน้ำตาลในรูปของสารประกอบไกลโคไซด์ (glycosides) และพบได้ในส่วนของช่องว่างภายในเซลล์ (cell vacuole) สารประกอบฟีโนลิกที่พบในธรรมชาติมีมากมายหลายชนิด มีลักษณะสูตรโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกัน ซึ่งกลุ่มใหญ่ที่สุดที่พบจะเป็นสารประกอบพวกฟลาโวนอยด์ (flavonoids) นอกจากนั้นยังมีสารประกอบต่างๆ เช่น simple monocyclic phenol, phenyl propanoid, phenolic quinine และ polyphenolic ซึ่งได้แก่พวก lignin, tannin เป็นต้น รวมทั้งยังพบว่ามีสารประกอบที่มีกลุ่มฟีนอล (phenolic unit) รวมอยู่ในโมเลกุลของโปรตีน อัลคาลอยด์ (alkaloid) และเทอร์พีนอยด์(terpenoid) เป็นต้น (อัญชนา, 2544) สารประกอบฟีโนลิกหลายชนิดมีสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชัน เช่น ฟลาโวนอยด์ กรดฟีโนลิก และ แทนนิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นต้น สารประกอบฟีโนลิกทำหน้าที่เป็นตัวกำจัดอนุมูลอิสระที่สำคัญ คือ อนุมูล peroxyl (Packer และคณะ, 1999) โดยมีกลไก 2 แบบ คือ เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีความเข้มข้นต่ำ เมื่อเทียบกับสารออกซิไดซ์ สารประกอบฟีโนลิกจะป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน นอกจากนี้อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาจะถูกทำให้เป็นสารที่มีความเสถียร ดังนั้นจึงสามารถป้องกันการเกิดขั้นตอนพถอพาเกชันได้ นอกจากนี้สารประกอบฟีโนลิกบางชนิดยังทำหน้าที่เป็นสารคีเลต ดักจับไอออนของโลหะเข้าไว้ในโมเลกุล เช่น เคอร์ซิทิน (quercetin) สารประกอบฟีโนลิกยังทำหน้าที่ทั้งเป็นสารให้อิเล็กตรอน หรือเป็นตัวให้ไฮโดรเจน และกำจัดออกซิเจนที่อยู่ในรูปแอคทีฟ ด้วยหน้าที่ต่างๆ ดังกล่าวจึงทำให้สารประกอบฟีโนลิกเป็นสารต้านออกซิเดชันที่สำคัญชนิดหนึ่งในพืชทั่วไป (Rice-Evans และ Miller, 1996)

2.5.6 สารต้านออกซิเดชันสังเคราะห์

สารต้านออกซิเดชันที่พัฒนาสังเคราะห์ขึ้นส่วนใหญ่จะออกแบบให้มีโมเลกุลขนาดเล็กและใช้โครงสร้างของสารต้านออกซิเดชันที่มีในธรรมชาติ นำมาดัดแปลงให้มีคุณสมบัติทางเคมีและมีฤทธิ์ที่ดีขึ้น เช่น สารต้านออกซิเดชันที่พัฒนาจากสารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติ โดยพัฒนามาจากโครงสร้างของวิตามินอี และโครงสร้างสารโพลีฟีนอล

Trolox หรือ 6-hydroxy-2, 5, 7, 8- tetramethylchroman-2-carboxylic acid มีสูตรโมเลกุลทางเคมี คือ $C_{14}H_{18}O_4$ เป็นอนุพันธ์ของวิตามินอีที่ดัดแปลงโครงสร้างโดยการเปลี่ยนสายอัลเคนเป็นหมู่คาร์บอกซิลิกมีสูตรโครงสร้างทำให้มีความสามารถละลายได้ดีในน้ำ แต่เนื่องจากความสามารถในการละลายน้ำได้ดี จึงทำให้การออกฤทธิ์เร็วกว่าวิตามินอี โดยวิตามินต้องใช้เวลานานเป็นชั่วโมงหรือเป็นวัน ในขณะที่ Trolox ออกฤทธิ์เกือบจะทันทีในวิธีการตรวจสอบหลายวิธี ในการวิจัยนิยมใช้ Trolox เป็นสารมาตรฐานในการตรวจสอบกิจกรรมต้านออกซิเดชัน

Gallic acid หรือ 3, 4, 5-hydroxybenzoic acid เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีสูตรโมเลกุลทางเคมีคือ $C_7H_6O_5$ Gallic acid เป็นส่วนประกอบของแทนนิน พบมากในองุ่น ใบชา เปลือกไม้โอ๊ค และพืชอื่นๆ โดยทั่วไปจะใช้เกี่ยวกับอุตสาหกรรมทางยา คุณสมบัติของ Gallic acid คือ สามารถยับยั้งเชื้อรา เชื้อไวรัส และมีคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชันได้ดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 การวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

2.6.1 วิธี DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical (Hou และคณะ, 2001)

อนุมูล DPPH$^{\bullet}$ เป็นอนุมูลไนโตรเจนที่คงตัว มีสีม่วง อยู่ในรูปอนุมูลอยู่แล้ว โดยไม่ต้องทำปฏิกิริยาเพื่อให้เกิดอนุมูลเหมือนกับกรณีอนุมูล ABTS$^{+\bullet}$ อนุมูล DPPH มีโครงสร้างทางเคมีแสดงดังภาพ 2.17 การวิเคราะห์เป็นการวัดความสามารถของสารทดสอบในการกำจัดอนุมูลอิสระโดยวิธีให้ไฮโดรเจนอะตอม การวัดทำโดยใช้เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) วัดการลดลงของสีเมื่อเติมสารต้านออกซิเดชันลงไป โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร DPPH radical ใช้ในการทดสอบความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระของสารตัวอย่าง (scavenging activity) สารละลายของ DPPH$^{\bullet}$ มีสีม่วงในเอทานอลและเมื่อได้รับ H จะเปลี่ยนเป็นสารละลายสีเหลือง ตามสมการดังนี้ (Blois, 1958)

$$\underset{\text{สีม่วง}}{DPPH^{\bullet}} + \underset{\text{ตัวอย่างทดสอบ}}{RH} \longrightarrow \underset{\text{สีเหลือง}}{DPPH\text{-}H} + R^{\bullet}$$

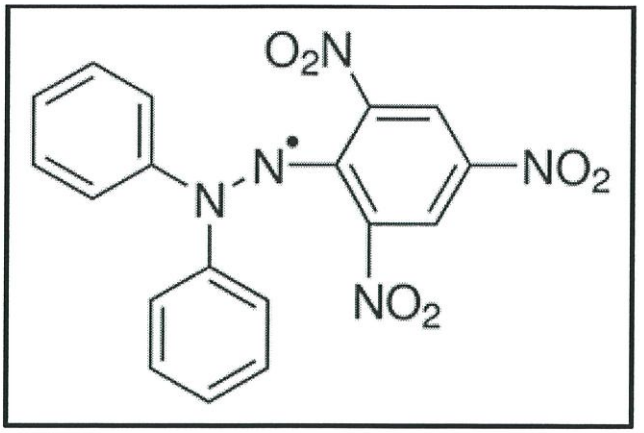
ค่าที่วัดได้จะแสดงความสามารถในการต้านออกซิเดชันออกมาในค่า % inhibition ตามสมการดังนี้

$$\% \text{ inhibition} = [(A_{517} \text{ control} - A_{517} \text{ test sample}) / A_{517} \text{ control})] \times 100$$

ข้อดีของวิธีนี้ คือ ทำได้ง่าย นิยมใช้เป็นวิธีเบื้องต้นในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติ

ข้อเสียของวิธีนี้ คือ อนุมูล DPPH$^{\bullet}$ มีความคงตัว ไม่ไวต่อการทำปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลที่เกิดใน เซลล์หรือร่างกาย ดังนั้นวิธีนี้จึงไม่สามารถแยกแยะจัดอันดับอนุมูลที่มีความไวสูงได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.17 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ DPPH radical

ที่มา : http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/d9132?lang=en&region=US

2.6.2 วิธี Hydroxyl (OH) radical *scavenging* activity (Ohkawa และคณะ, 1979)

Hydroxyl radical ($OH^{\bullet}$) เป็นอนุมูลอิสระที่ว่องไว สามารถจู่โจมชีวโมเลกุลที่สำคัญในร่างกาย โดยการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่อย่างต่อเนื่อง (Spencer และคณะ, 1994) สิ่งมีชีวิตสามารถสราง $OH^{\bullet}$ radical โดย 2 กลไก ไดแก

2.6.2.1 ปฏิกิริยาของไอออนโลหะทรานซิชันกับไฮโดรเจนเปอรออกไซด (H_2O_2) แม้วาเกลือของโลหะทรานซิชันทั่วไปทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 ได $OH^{\bullet}$ แต่ในร่างกายนั้น เป็นไปได้ว่าเกิดจากเหล็ก Fe^{2+} ทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 ได $OH^{\bullet}$ โดยเรียกปฏิกิริยานี้ว่า Fenton reaction ดังสมการ

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{2+} + OH^{\bullet} + OH^{-} \text{ (Fenton reaction)}$$

2.6.2.2 การแตกตัวของน้ำ เนื่องจากการถูกแสงหรือรังสี ดังสมการ

$$H_2O + h\nu \longrightarrow H_2O^{+\bullet} + e^{-}$$

$$H_2O^{+\bullet} + H_2O \longrightarrow OH^{\bullet} + H_3O^{+}$$

ในการศึกษาความสามารถในการยับยั้ง $OH^{\bullet}$ radical ของสารตัวอย่าง ทำการสังเคราะห Hydroxyl radical ($OH^{\bullet}$) โดยทั่วไปไอออนของโลหะมักไม่ดูดกลืนแสงในช่วงอุลตร้าไวโอเลตและแสงที่ตามองเห็น โลหะที่อยู่ในกลุ่มทรานสิชันบางตัวที่สามารถนำมาวิเคราะห์โดยวิธีนี้ได้โดยนำมาทำให้อยู่ในรูปของสารประกอบเชิงซ้อนกับลิแกนด์บางชนิด เช่น ไทโอไซยาเนต, 1,10-phenanthroline เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอออนของเหล็ก (II) สามารถเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับ 1,10-phenanthroline ได้เป็น $Fe(C_{12}H_8N_2)_3^{2+}$ สามารถดูดกลืนแสงในช่วงที่ตามองเห็นได้โดยสามารถตรวจสอบได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 nm (Mathew and Abraham, 2006) จากนั้นนำไปคำนวณเปน % inhibition ไดตามสมการ

$$\% \text{ Inhibition} = [(A_{532} \text{ control} - A_{532} \text{ test sample}) / A_{532} \text{ control}] \times 100$$

(http://archive.lib.cmu.ac.th/full/T/2551/biol0451tp_ch2.pdf, 20 ตุลาคม 2558)

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.7.1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องของการหมักคอมบูชา

Teoh และคณะ (2004) ทำการหมักคอมบูชาโดยใช้ชาที่เพิ่มความหวานร่วมกับยีสต์และแบคทีเรียที่สร้างกรดอะซิติก โดยใช้สายพันธุ์ของยีสต์ที่แตกต่างกันในการหมัก โดยสายพันธุ์ยีสต์แยกจากผลิตภัณฑ์คอมบูชาที่มีจำหน่ายทั่วไป 4 ชนิด ขณะทำการหมักจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีการสร้างแผ่นเซลลูโลสและส่วนที่เป็นของเหลว (น้ำหมัก) ของคอมบูชา โดยจำนวนและความหลากหลายของสายพันธุ์แตกต่างกันในแต่ละผลิตภัณฑ์ ประกอบด้วย *Brettanomyces bruxellensis, Candida stellate, Schizosaccharomyces pombe, Torulaspora delbrueckii, Zygosaccharomyces bailii* โดยส่วนใหญ่จะเป็นสายพันธุ์ที่ทนต่อแรงดันออสโมซิส มีกิจกรรมการหมัก และเป็นสายพันธุ์ที่ทนกรด

2.7.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องของการต้านอนุมูลอิสระ

Chu และ Chen (2006) ตรวจสอบผลโดยใช้ free radical scavenging assay พบว่าคอมบูชามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นขณะเกิดการหมัก ศักยภาพของสารต้านอนุมูลอิสระเฉลี่ยของคอมบูชาหลังจากการหมักเป็นเวลา 15 วันเพิ่มขึ้นทั้ง DPPH ABTS และการยับยั้งของ linoleic acid peroxidation ขณะที่ค่าความสามารถในการดักจับ ferrous ion ลดลง และปริมาณฟีนอลทั้งหมดเพิ่มขึ้น โดยค่าของกิจกรรมขึ้นอยู่กับช่วงการหมัก และที่มาของหัวเชื้อตั้งต้น และแสดงให้เห็นว่าสารทีรูบิจิน (Thearubigin) ในชาหมักทำให้เกิดการย่อยทางธรรมชาติขณะกระบวนการหมัก ทำให้เกิดปล่อยสารโมเลกุลเล็กที่มีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระสูงออกมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Chu และ Sheng-Che (2006) ได้ศึกษาผลของระยะเวลาการหมักต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของชาหมักคอมบูชา พบว่าชาหมักคอมบูชาจากแหล่งต่างๆ มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกัน และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระขึ้นอยู่กับระยะเวลาในการหมัก ศักยภาพของฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของชาหมักโดยวิธี DPPH เพิ่มขึ้นประมาณร้อยละ 70 ความสามารถในการดักจับ ABTS เพิ่มขึ้นประมาณร้อยละ 40 และการยับยั้งปฏิกิริยา peroxidation ของ linoleic acid เพิ่มขึ้นประมาณร้อยละ 49 ขณะที่ความสามารถในการดักจับเฟอร์รัสอิออน ลดลงร้อยละ 81 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 98 ซึ่งแสดงให้เห็นได้ว่า thearubigin อาจเกิดการย่อยสลายระหว่างกระบวนการหมัก ทำให้มีการปลดปล่อยโมเลกุลเล็ก ๆ ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง

Lee Yian Hoon และคณะ (2014) ได้ศึกษา คอมบูชา “tea fungus” ช่วยเพิ่มปริมาณสารโพลีฟีนอลในชา และเพิ่มกิจกรรมสารต้านอนุมูลอิสระและกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสของชาบริโภค 5 ชนิด จากการศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระและกิจกรรมยับยั้งการย่อยแป้งของชาดำจีน ชาอู่หลง ชาเขียว ชาดำศรีลังกา และชา Rooibos ซึ่งจะนำชามาหมักกับ “tea fungus” (คอมบูชา) เป็นเวลา 7วัน และนำมาตรวจสอบค่าพีเอช ไทไทรตหาปริมาณกรดและวัดสี พบว่าชาที่ผ่านการหมักเป็นเวลา 1 วันมีค่าพีเอชลดลงและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P<0.05$) เมื่อเทียบกับชาที่ไม่ผ่านการหมัก และชาที่ผ่านการหมักเป็นเวลา 5 วัน มีความเป็นกรดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ชาทั้ง 5 ชนิดมีสีจางลง ชา Rooibos ชาดำศรีลังกาและชาเขียวมีค่าปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดและกิจกรรมสารต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่หนึ่งจนถึงวันสุดท้ายของการหมัก ซึ่งพบว่าปริมาณสารพอลีฟีนอลที่เพิ่มขึ้นทำให้กิจกรรมสารต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นด้วย และชาหมักคอมบูชาทั้ง 5 ชนิดมีคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้ดีกว่าเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส

Fu และคณะ (2013) ศึกษาการเปรียบเทียบความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระและความสามารถในการรีดิวซ์ (TRP) ของคอมบูชาที่เตรียมจากชาเขียวราคาถูก (LGTK) ชาดำ (BTK) และผงชา (TPK) พบว่าการใช้ชาเขียวราคาถูกมีความสามารถในการดักจับ 2,2-diphenyl-1-picryhydrazyl (DPPH) , superoxide anion และ hydroxyl radicals ในขณะที่ชาดำมีความสามารถในการรีดิวซ์ (TRP สูง) การเปลี่ยนแปลงปริมาณของโพรไบโอติกในชาเขียวราคาถูกที่มีการตรวจสอบในระหว่างการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ พบว่าปริมาณของเชื้อแบคทีเรียอะซิติก มีปริมาณลดลงเล็กน้อยหลังจากการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เป็นเวลา 10 วัน สำหรับปริมาณแบคทีเรียแลกติกมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การลดลงอย่างมีนัยสำคัญและพบอัตราการอยู่รอดร้อยละ 0.98 ในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เป็นเวลา 8 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 วัตถุดิบ

3.1.1.1 ชาดำ (ตราสามม้าเบอร์ 1)

3.1.1.2 ชาเขียว (ตราหลงจิ่ง)

3.1.1.3 ชาอู่หลง (ตรานายพลต้วนเบอร์ 12)

3.1.1.4 น้ำตาลซูโครส (น้ำตาลทรายแดงตราลิน)

3.1.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.1.2.1 2,2-diphenyl-1-picryhydrazyl

3.1.2.2 Absolute ethanol

3.1.2.3 Gallic acid

3.1.2.4 Folin-Ciocalteu Reagent

3.1.2.5 Sodium carbonate anhydrous

3.1.2.6 Sodium hydroxide

3.1.2.7 Phenolpthalein

3.1.3 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.1.3.1 โหลแก้วขนาด 850 มิลลิลิตร

3.1.3.2 ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

3.1.3.3 ปิเปต

3.1.3.4 ไมโครปิเปต

3.1.3.5 บิวเรตต์

3.1.3.6 หลอดทดลอง

3.1.3.7 บีกเกอร์

3.1.3.8 ขวดปรับปริมาตร

3.1.3.9 ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.1.3.10 ไมโครเวลเพลทแบบ 96 หลุม

3.1.3.11 เครื่องชั่งน้ำหนักสี่ตำแหน่งยี่ห้อ sartorius รุ่น TE2145

3.1.3.12 หม้อนึ่งอัดไอ (Autoclave) ยี่ห้อ TOMY รุ่น ES-315

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.3.13 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบไมโครเพลท (Microplate reader) ยี่ห้อ Labsystem รุ่น Labsystem iEMS Reader MF

3.1.3.14 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) ยี่ห้อ OHAUS รุ่น starter 2100

3.1.3.15 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) ยี่ห้อ HERMLE รุ่น Z383K

3.1.3.16 เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer) ยี่ห้อ Scientific Industries รุ่น vortex-GENIE 2 G560E

3.2 ขั้นตอนในการดำเนินงาน

3.2.1 การเตรียมหัวเชื้อชาหมักคอมบูชา

นำน้ำสะอาดปริมาตร 1500 มิลลิลิตร ต้มให้เดือด จากนั้นนำชาดำปริมาณร้อยละ 0.4 ที่ห่อด้วยผ้าขาวบาง (6 กรัม) ใส่ลงในน้ำที่ต้มจนเดือดเป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำชาออกจากน้ำชา และเติมน้ำตาลซูโครสร้อยละ 7 น้ำหนักต่อปริมาตร (105 กรัม) คนให้น้ำตาลซูโครสละลาย ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเทน้ำหมักใส่ในขวดโหลที่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยเติมน้ำชาปริมาตร 1000 มิลลิลิตร จากนั้นเติมแผ่นเซลลูโลสเก่าลงในน้ำชาร้อยละ 3 น้ำหนักโดยปริมาตร (30 กรัม) และเติมส่วนที่เป็นน้ำหมักเดิมร้อยละ 10 ปริมาตรต่อปริมาตร (100 มิลลิลิตร) ปิดปากโหลด้วยผ้าขาวบาง รัดให้แน่น บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10 วัน

3.2.2 การหมักคอมบูชา

หมักโดยใช้ชา 3 ชนิด คือ ชาดำ ชาเขียว และ ชาอู่หลง โดยนำน้ำสะอาด 1.5 ลิตร ต้มให้เดือด นำชาแต่ละชนิดห่อด้วยผ้าขาวบางร้อยละ 1 น้ำหนักต่อปริมาตร (15 กรัม) ใส่ลงในน้ำเดือดนาน 5 นาที จากนั้นนำชาออก เติมน้ำตาลซูโครสร้อยละ 15 น้ำหนักต่อปริมาตร (225 กรัม) ละลายให้เข้ากัน ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำน้ำชาใส่ขวดโหลหมักที่ผ่านการฆ่าเชื้อ โหลละ 400 มิลลิลิตร เติมแผ่นเซลลูโลสเก่าลงในน้ำชาร้อยละ 3 น้ำหนักโดยปริมาตร (12 กรัม) และน้ำหมักเดิมร้อยละ 10 ปริมาตรต่อปริมาตร (40 มิลลิลิตร) หมักที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10 วัน เก็บตัวอย่างในวันที่ 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 และ 10 นำน้ำหมักที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใส (supernatant) ที่ได้วิเคราะห์ค่าต่างๆดังนี้ ค่าพีเอชของน้ำหมัก ปริมาณกรดทั้งหมด ทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด

3.2.3 การวิเคราะห์

3.2.3.1 ค่าพีเอชของน้ำหมัก

วิเคราะห์โดยใช้เครื่อง pH meter รุ่น starter 2100

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.3.2 ปริมาณกรดทั้งหมด (total acidity, TA) ในรูปของกรดอะซิติก โดยใช้วิธีของ Chen และ Liu (2000)

ปิเปตน้ำหมักที่ได้ 10 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ทำการเจือจางกับน้ำปลอดคาร์บอนไดออกไซด์ปริมาตร 90 มิลลิลิตร หยดสารละลายฟีนอฟทาลีนความเข้มข้นร้อยละ 1 จำนวน 3 หยด นำมาไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล บันทึกปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ทำให้สารละลายตัวอย่างเปลี่ยนเป็นสีชมพู (จุดยุติ) ตามสูตรดังนี้

$$\text{ปริมาณกรดทั้งหมด (ร้อยละ)} = \frac{N \times V(NaOH) \times 60 \times 100}{V(Sample) \times 1000}$$

เมื่อ N = ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

V (NaOH) = ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไทเทรต (มิลลิลิตร)

V (Sample) = ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้ (มิลลิลิตร)

น้ำหนักกรัมสมมูลของกรดอะซิติก = 60

3.2.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด

อ้างอิงจากวิธีการของ Sun และคณะ (2015) โดยปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ไม่ทำการเจือจาง และสารละลายตัวอย่างที่ทำการเจือจาง (10 20 50 100 และ 200 เท่า) 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับ โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้นร้อยละ 2 ปริมาตรต่อปริมาตร 2 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเติมสารละลาย Folin-ciocalteu reagent ความเข้มข้นร้อยละ 50 ปริมาตรต่อปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 690 นาโนเมตร ด้วย 96-well microplate reader ทำการทดลอง 3 ซ้ำ คำนวณหาปริมาณ total phenolic compound (mg/ml) จากกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน Gallic acid และคำนวณให้อยู่ในหน่วย ไมโครกรัม ของ gallic acid equivalent (GAE) ต่อมิลลิลิตรของตัวอย่าง (mg GAE/mL sample)

3.2.3.4 วิธีการทดสอบฤทธิ์การกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH

วิเคราะห์ตามวิธีของ Fu และคณะ (2014) โดยนำชาหมักที่ไม่ทำการเจือจาง และน้ำชาหมักที่ทำการเจือจาง (50 100 200 และ 300 เท่า) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย DPPH ที่ละลายใน Absolute ethanol ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 20 นาที และวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

492 นาโนเมตร ด้วย 96-well microplate reader ทำการทดลอง 3 ซ้ำ สารมาตรฐานคือสารละลาย DPPH กับ ethanol การคำนวณฤทธิ์ในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน ตามสมการดังนี้

$$\% \text{ Scavenging} = \frac{(A_{control} - A_{extract}) \times 100}{A_{control}}$$

$A_{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH

$A_{extract}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH

3.2.4 วิเคราะห์ทางสถิติ

ผลการทดลองแสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และวิเคราะห์สถิติโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 ผลการศึกษาการหมักคอมบูชาโดยใช้ชาชนิดต่างๆ

4.1.1 ค่าพีเอชของคอมบูชา

จากการหมักคอมบูชาโดยใช้ชาดำ ชาเขียว และชาอู่หลง หมักเป็นเวลา 10 วัน เก็บตัวอย่างทุกวัน พบว่าการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของคอมบูชาทั้งสามชนิดมีค่าลดลงตลอดระยะเวลาการหมักแสดงดังตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.1 การที่ค่าพีเอชลดลงเนื่องมาจากมีกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ ถูกสร้างขึ้นมาระหว่างกระบวนการหมัก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Lee และคณะ (2014) ซึ่งได้ศึกษาเกี่ยวกับกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ และปัจจัยอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับการหมักคอมบูชา เช่น พีเอช ปริมาณกรดทั้งหมด ซึ่งได้ทำการเปรียบเทียบชา (5 ชนิด) ที่ผ่านการหมักกับชาที่ไม่ได้ผ่านการหมัก และพบว่าชาที่ผ่านการหมักทั้งห้าชนิดมีการลดลงของค่าพีเอชอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เนื่องจากระหว่างการหมักมีการผลิตกรดอินทรีย์เพิ่มมากขึ้น โดยแบคทีเรียและยีสต์ที่เป็นหัวเชื้อในการหมักคอมบูชา

จากการทดลองพบว่าคอมบูชาจากชาดำมีการลดลงของพีเอชสูงกว่าชาเขียวและชาอู่หลงในวันสุดท้ายของการหมัก (10 วัน) เมื่อระยะเวลาการหมักนานขึ้น ค่าพีเอชของคอมบูชาจะลดลงและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยเฉพาะในชาดำ ในวันสุดท้ายของการหมักคอมบูชาจากชาดำ ชาเขียว และชาอู่หลง มีค่าพีเอช 2.18±0.03 2.19±0.02 และ 2.18±0.16 ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงดังรูปที่ 4.2

4.1.2. ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติก

ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติกจะเพิ่มตลอดระยะเวลาการหมัก เมื่อพิจารณาระยะเวลาการหมัก พบว่าในช่วงที่ 8-10 ของการหมักชาแต่ละชนิด ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติกของคอมบูชาแต่ละชนิดไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่มีความแตกต่างทางสถิติกับการหมักในช่วง 1-7 วันแรก วันสุดท้ายของการหมัก (10วัน) คอมบูชาทั้งสามชนิดมีปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติกสูงสุด โดยพบว่าคอมบูชาจากชาดำ ชาเขียว และชาอู่หลง มีร้อยละ 2.41±0.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.20±0.07 และ 1.94±0.01 ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.3 เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงดังรูปที่ 4.4 สอดคล้องกับงานวิจัยของ Chakravorty และคณะ (2016) ศึกษาเกี่ยวกับกลุ่มจุลินทรีย์และคุณสมบัติทางชีวเคมีของคอมบูชา เช่น พีเอช ปริมาณกรดอินทรีย์ หมักคอมบูชาเป็นเวลา 21 วัน พบว่าปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติกเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาในการหมัก และ Loncar และคณะ (2006) ศึกษาเกี่ยวกับปัจจัยที่มีผลต่อการหมักคอมบูชาจากชาดำ พบว่ามีปริมาณกรดอินทรีย์เพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาในการหมัก (10 วัน) โดยมีปริมาณกรดอินทรีย์สูงสุดในวันที่ 10 ของการหมัก

4.1.3 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด

จากการหมักคอมบูชาจากชาสามชนิด เป็นเวลา 10 วัน พบว่าคอมบูชาทุกชนิดมีปริมาณฟีนอลิกเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมัก ปริมาณฟีนอลิกจะสูงสุดในช่วง 8-10 วัน โดยพบว่าวันที่ 10 ของการหมักคอมบูชาจากการหมักชาดำ ชาเขียว และชาอู่หลง (ที่ไม่เจือจาง)มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด 5.74 ± 0.01 5.73 ± 0.00 และ 5.47 ± 0.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 4.3-4.5 และรูปที่ 4.5-4.6 ทั้งนี้เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกในชาถูกย่อยสลายในระหว่างกระบวนการหมักในสภาวะที่เป็นกรด โดยเอนไซม์จากแบคทีเรียและยีสต์ที่เป็นหัวเชื้อคอมบูชา ย่อยสลายโครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกให้มีโมเลกุลเล็กลง ทำให้คอมบูชาที่ได้มีปริมาณฟีนอลิกเพิ่มขึ้น (Jayabalan และคณะ,2008) ซึ่งการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Lee และคณะ (2014) ซึ่งพบว่าปริมาณฟีนอลิกของคอมบูชาจะเพิ่มขึ้นตั้งแต่วันแรกจนถึงวันสุดท้ายของการหมัก และจะมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และจากการหมักคอมบูชาจากชาทั้งสามชนิด เมื่อเจือจางคอมบูชาที่ความเจือจาง 10 20 50 100 และ 200 เท่า พบว่าปริมาณฟีนอลิกจะลงลดตามความเจือจางที่เพิ่มขึ้น และเมื่อเปรียบเทียบคอมบูชาจากชาทั้งสามชนิด พบว่า จากการหมัก 10 วัน คอมบูชาจากชาดำมีปริมาณฟีนอลิกสูงกว่าชาเขียว และชาอู่หลง และมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงดังรูปที่ 4.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

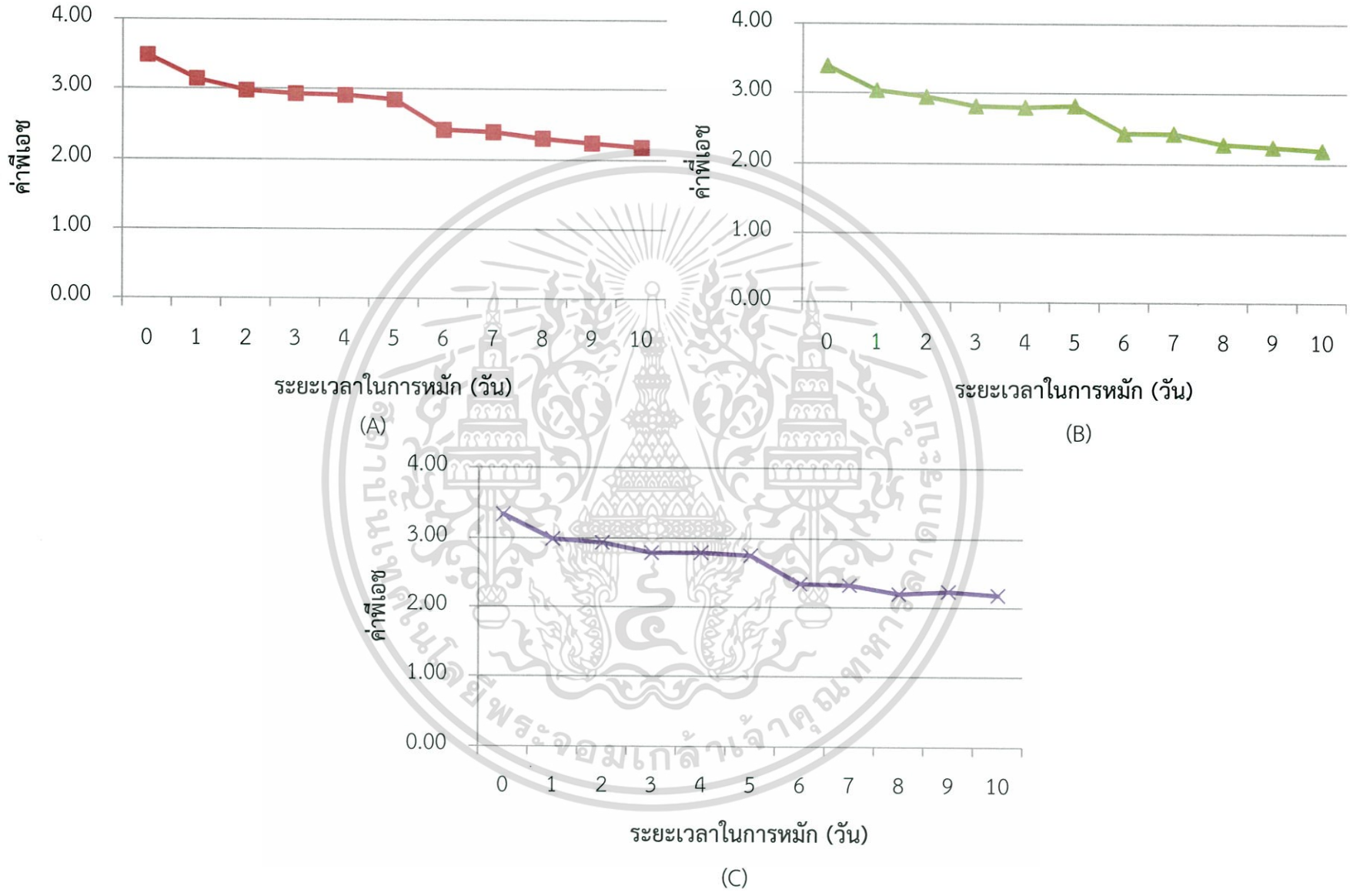
ตารางที่ 4.1 ค่าพีเอชในคอมบูชาจากการหมักชาชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	พีเอชของน้ำหมัก		
	ชาดำ	ชาเขียว	ชาอู่หลง
0	$3.48^{a} \pm 0.02$	$3.39^{a} \pm 0.01$	$3.34^{a} \pm 0.05$
1	$3.14^{b} \pm 0.03$	$3.03^{b} \pm 0.04$	$2.99^{b} \pm 0.03$
2	$2.97^{c} \pm 0.03$	$2.94^{c} \pm 0.08$	$2.94^{b} \pm 0.03$
3	$2.93^{d} \pm 0.03$	$2.81^{d} \pm 0.03$	$2.79^{c} \pm 0.02$
4	$2.91^{d} \pm 0.04$	$2.80^{d} \pm 0.03$	$2.80^{c} \pm 0.02$
5	$2.85^{e} \pm 0.02$	$2.82^{d} \pm 0.06$	$2.76^{c} \pm 0.03$
6	$2.42^{f} \pm 0.01$	$2.43^{e} \pm 0.02$	$2.34^{d} \pm 0.08$
7	$2.39^{f} \pm 0.02$	$2.43^{e} \pm 0.02$	$2.33^{de} \pm 0.09$
8	$2.30^{g} \pm 0.02$	$2.28^{f} \pm 0.03$	$2.20^{def} \pm 0.05$
9	$2.24^{h} \pm 0.01$	$2.24^{fg} \pm 0.01$	$2.24^{ef} \pm 0.14$
10	$2.18^{i} \pm 0.03$	$2.19^{g} \pm 0.02$	$2.18^{f} \pm 0.16$

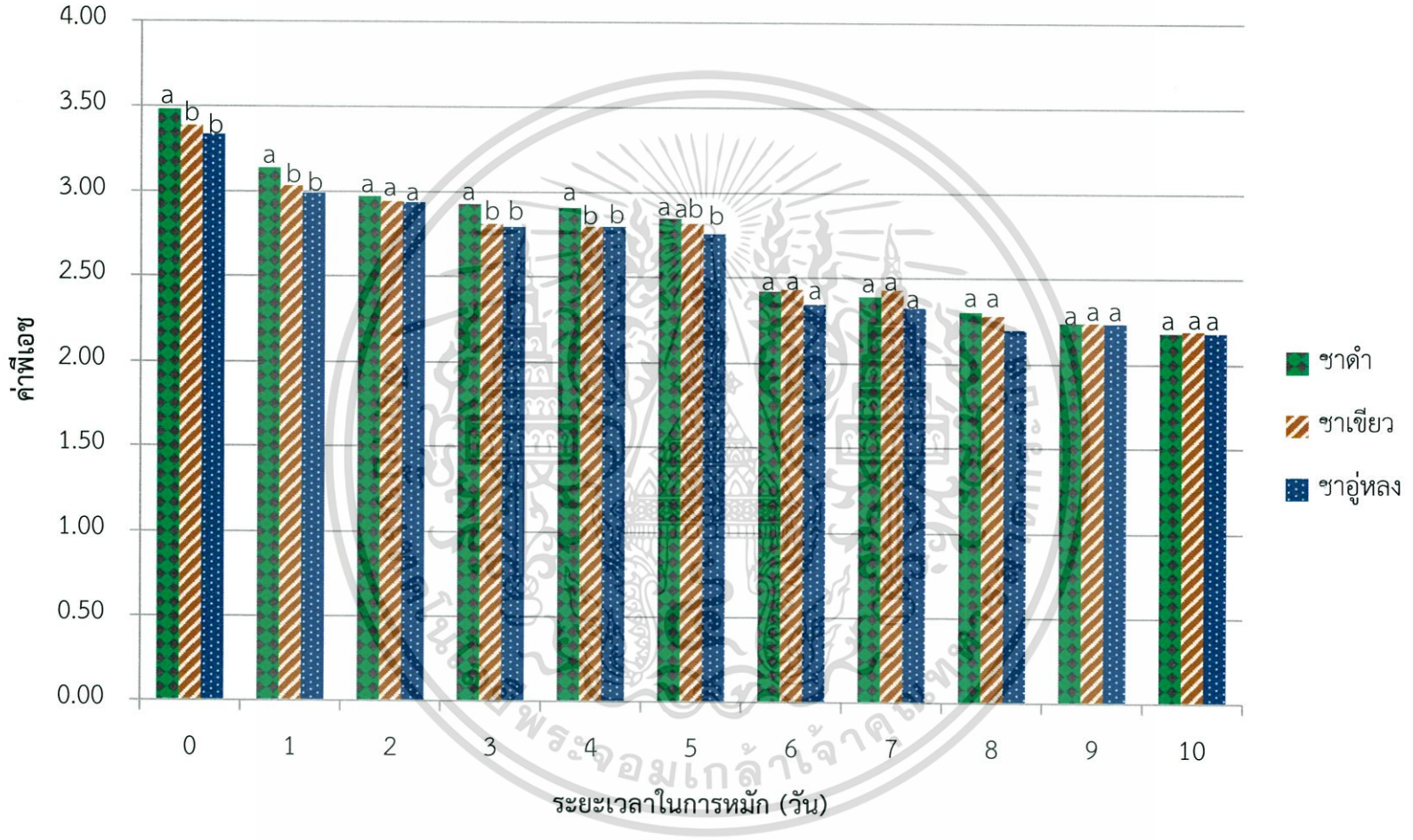
หมายเหตุ

- ค่าพีเอชแสดงในรูปค่าเฉลี่ย (Mean) ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviations, SD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ
- ^{abc} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 ค่าพีเอชในคอมบูชาจากการหมัก (A) ชาดำ (B) ชาเขียว และ (C) ชาอู่หลง ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน



รูปที่ 4.2 เปรียบเทียบค่าพีเอชในคอมบูชาจากการหมักชาชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน

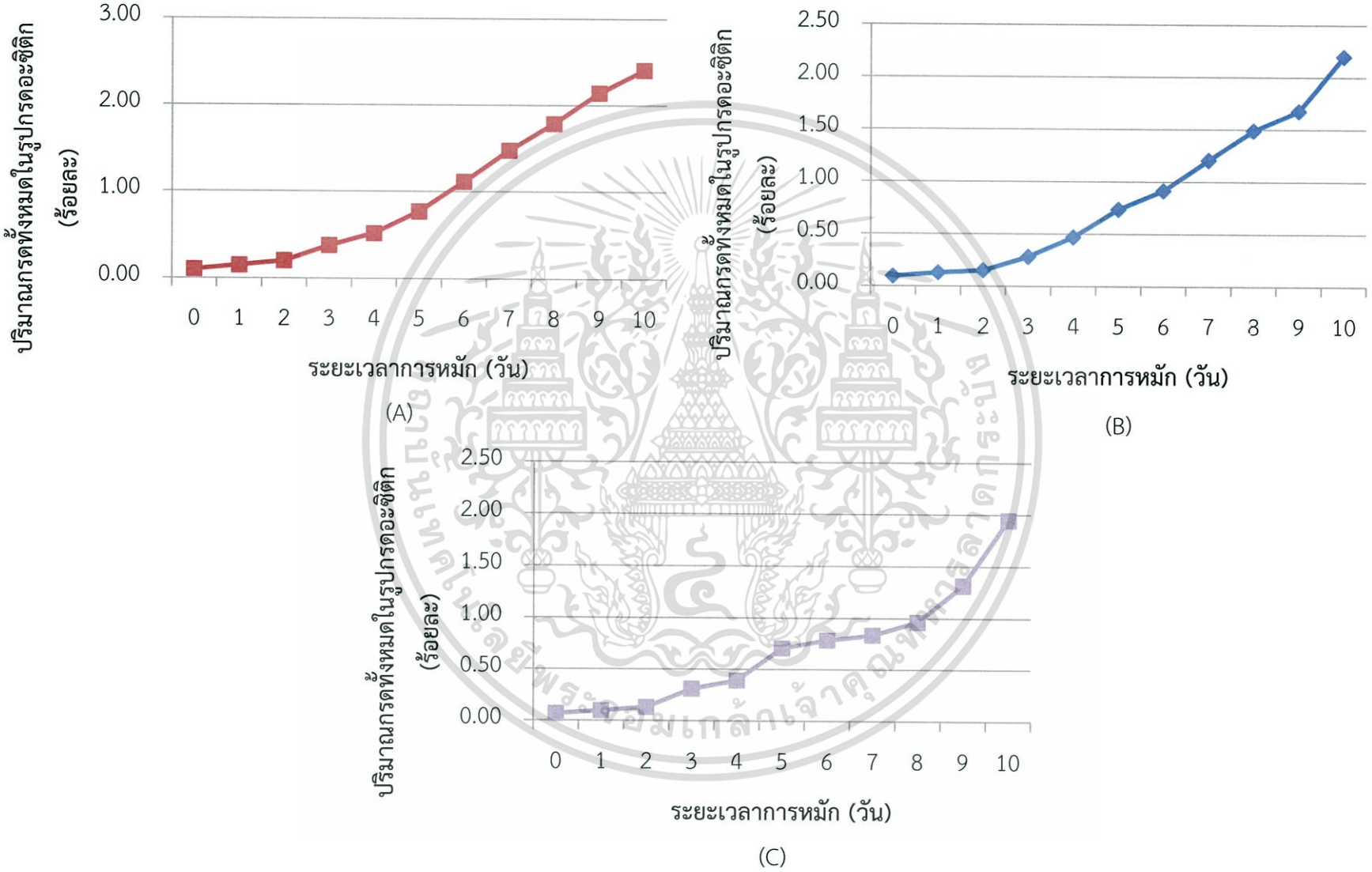
ตารางที่ 4.2 ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดอะซิติกในคอมบูชาจากการหมักชาชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติก (ร้อยละ)		
	ชาดำ	ชาเขียว	ชาอู่หลง
0	$0.10^{a} \pm 0.00$	$0.10^{a} \pm 0.01$	$0.07^{a} \pm 0.01$
1	$0.15^{b} \pm 0.00$	$0.13^{b} \pm 0.00$	$0.09^{b} \pm 0.02$
2	$0.20^{c} \pm 0.02$	$0.15^{c} \pm 0.02$	$0.13^{c} \pm 0.00$
3	$0.38^{d} \pm 0.03$	$0.28^{d} \pm 0.05$	$0.31^{d} \pm 0.03$
4	$0.52^{e} \pm 0.03$	$0.47^{e} \pm 0.01$	$0.39^{e} \pm 0.00$
5	$0.77^{f} \pm 0.10$	$0.74^{f} \pm 0.05$	$0.71^{f} \pm 0.03$
6	$1.11^{g} \pm 0.03$	$0.91^{g} \pm 0.03$	$0.79^{g} \pm 0.01$
7	$1.47^{h} \pm 0.06$	$1.20^{h} \pm 0.01$	$0.84^{h} \pm 0.01$
8	$1.78^{i} \pm 0.04$	$1.49^{i} \pm 0.03$	$0.97^{i} \pm 0.01$
9	$2.14^{ij} \pm 0.08$	$1.67^{i} \pm 0.01$	$1.32^{i} \pm 0.02$
10	$2.41^{j} \pm 0.00$	$2.20^{i} \pm 0.07$	$1.94^{j} \pm 0.01$

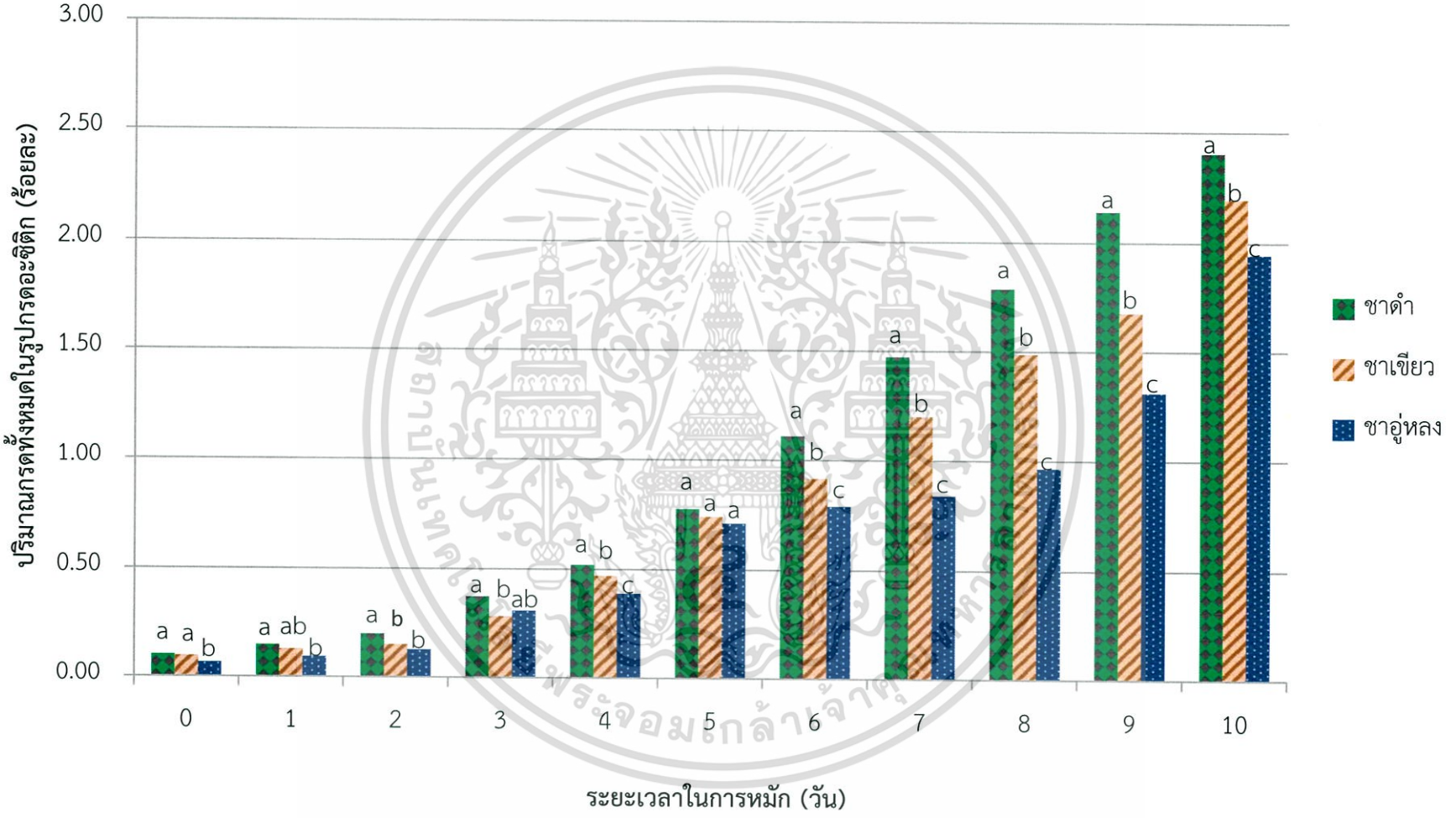
หมายเหตุ

- ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดอะซิติกแสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ
- ^{abc} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดอะซิติกในคอมบูชาจากการหมัก (A) ชาดำ (B) ชาเขียว และ (C) ชาอู่หลง ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน



รูปที่ 4.4 เปรียบเทียบปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดอะซิติกในคอมบูชาจากการหมักชาชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน

ตารางที่ 4.3 ปริมาณฟีนอลิกในคอมบูชาจากการหมักชาดำ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	ปริมาณฟีนอลิกในคอมบูชาจากการหมักชาดำ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)					
	ไม่เจือจาง	เจือจาง 10 เท่า	เจือจาง 20 เท่า	เจือจาง 50 เท่า	เจือจาง 100 เท่า	เจือจาง 200 เท่า
0	$0.38^{k} \pm 0.01$	$0.32^{j} \pm 0.01$	$0.20^{g} \pm 0.00$	$0.08^{i} \pm 0.01$	$0.02^{h} \pm 0.00$	$0.00^{f} \pm 0.00$
1	$2.39^{j} \pm 0.02$	$0.43^{i} \pm 0.01$	$0.19^{g} \pm 0.01$	$0.08^{i} \pm 0.00$	$0.02^{g} \pm 0.01$	$0.02^{e} \pm 0.00$
2	$2.26^{i} \pm 0.00$	$0.57^{h} \pm 0.01$	$0.33^{f} \pm 0.00$	$0.12^{h} \pm 0.00$	$0.05^{f} \pm 0.00$	$0.03^{d} \pm 0.01$
3	$2.95^{h} \pm 0.01$	$0.74^{g} \pm 0.00$	$0.38^{e} \pm 0.00$	$0.16^{g} \pm 0.00$	$0.12^{c} \pm 0.00$	$0.07^{c} \pm 0.01$
4	$3.04^{g} \pm 0.00$	$0.79^{f} \pm 0.00$	$0.48^{d} \pm 0.00$	$0.18^{f} \pm 0.00$	$0.13^{c} \pm 0.01$	$0.10^{a} \pm 0.01$
5	$3.32^{f} \pm 0.01$	$0.95^{e} \pm 0.00$	$0.48^{d} \pm 0.01$	$0.18^{f} \pm 0.00$	$0.16^{a} \pm 0.01$	$0.10^{a} \pm 0.01$
6	$3.44^{e} \pm 0.00$	$0.97^{d} \pm 0.01$	$0.51^{c} \pm 0.00$	$0.29^{b} \pm 0.01$	$0.09^{e} \pm 0.00$	$0.07^{c} \pm 0.00$
7	$3.62^{d} \pm 0.00$	$1.04^{b} \pm 0.01$	$0.54^{b} \pm 0.01$	$0.25^{c} \pm 0.00$	$0.10^{d} \pm 0.00$	$0.07^{c} \pm 0.00$
8	$4.20^{c} \pm 0.02$	$1.04^{b} \pm 0.01$	$0.51^{c} \pm 0.01$	$0.32^{a} \pm 0.00$	$0.13^{b} \pm 0.01$	$0.10^{a} \pm 0.01$
9	$4.49^{b} \pm 0.02$	$1.14^{a} \pm 0.01$	$0.59^{a} \pm 0.00$	$0.21^{d} \pm 0.01$	$0.13^{b} \pm 0.01$	$0.08^{c} \pm 0.00$
10	$5.74^{a} \pm 0.01$	$1.01^{c} \pm 0.01$	$0.54^{b} \pm 0.01$	$0.20^{e} \pm 0.00$	$0.12^{c} \pm 0.00$	$0.09^{b} \pm 0.00$

หมายเหตุ

- ปริมาณฟีนอลิกแสดงในรูปค่าเฉลี่ย (Mean) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviations, SD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ
- ^{abc} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางที่ 4.4 ปริมาณฟีนอลิกในคอมบูชาจากการหมักชาเขียว ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	ปริมาณฟีนอลิกในคอมบูชาจากการหมักชาเขียว (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)					
	ไม่เจือจาง	เจือจาง 10 เท่า	เจือจาง 20 เท่า	เจือจาง 50 เท่า	เจือจาง 100 เท่า	เจือจาง 200 เท่า
0	$0.18^{j} \pm 0.00$	$0.26^{j} \pm 0.00$	$0.12^{i} \pm 0.00$	$0.06^{b} \pm 0.01$	$0.04^{f} \pm 0.00$	$0.04^{def} \pm 0.01$
1	$4.15^{i} \pm 0.05$	$0.28^{i} \pm 0.00$	$0.15^{h} \pm 0.01$	$0.08^{a} \pm 0.00$	$0.06^{e} \pm 0.00$	$0.05^{cde} \pm 0.00$
2	$4.27^{h} \pm 0.00$	$0.29^{h} \pm 0.01$	$0.16^{g} \pm 0.01$	$0.07^{a} \pm 0.00$	$0.05^{e} \pm 0.00$	$0.03^{g} \pm 0.01$
3	$4.55^{g} \pm 0.00$	$0.33^{g} \pm 0.01$	$0.17^{f} \pm 0.00$	$0.11^{ef} \pm 0.00$	$0.07^{d} \pm 0.00$	$0.02^{h} \pm 0.01$
4	$5.18^{f} \pm 0.00$	$0.43^{f} \pm 0.01$	$0.25^{e} \pm 0.00$	$0.11^{def} \pm 0.01$	$0.08^{cd} \pm 0.00$	$0.04^{efg} \pm 0.00$
5	$5.21^{e} \pm 0.01$	$0.50^{e} \pm 0.00$	$0.24^{e} \pm 0.00$	$0.09^{f} \pm 0.00$	$0.08^{d} \pm 0.00$	$0.05^{cde} \pm 0.01$
6	$5.34^{b} \pm 0.00$	$0.54^{d} \pm 0.00$	$0.31^{d} \pm 0.00$	$0.11^{ef} \pm 0.00$	$0.07^{d} \pm 0.00$	$0.04^{fg} \pm 0.00$
7	$5.45^{c} \pm 0.01$	$0.64^{c} \pm 0.00$	$0.32^{c} \pm 0.01$	$0.14^{cde} \pm 0.00$	$0.07^{d} \pm 0.00$	$0.05^{cd} \pm 0.00$
8	$5.67^{b} \pm 0.00$	$0.65^{c} \pm 0.01$	$0.34^{b} \pm 0.00$	$0.15^{c} \pm 0.01$	$0.08^{c} \pm 0.00$	$0.05^{c} \pm 0.01$
9	$5.72^{a} \pm 0.00$	$0.66^{b} \pm 0.00$	$0.37^{a} \pm 0.01$	$0.15^{cd} \pm 0.00$	$0.12^{a} \pm 0.01$	$0.07^{b} \pm 0.00$
10	$5.73^{a} \pm 0.00$	$0.71^{a} \pm 0.00$	$0.35^{b} \pm 0.00$	$0.16^{c} \pm 0.01$	$0.10^{b} \pm 0.01$	$0.08^{a} \pm 0.00$

หมายเหตุ

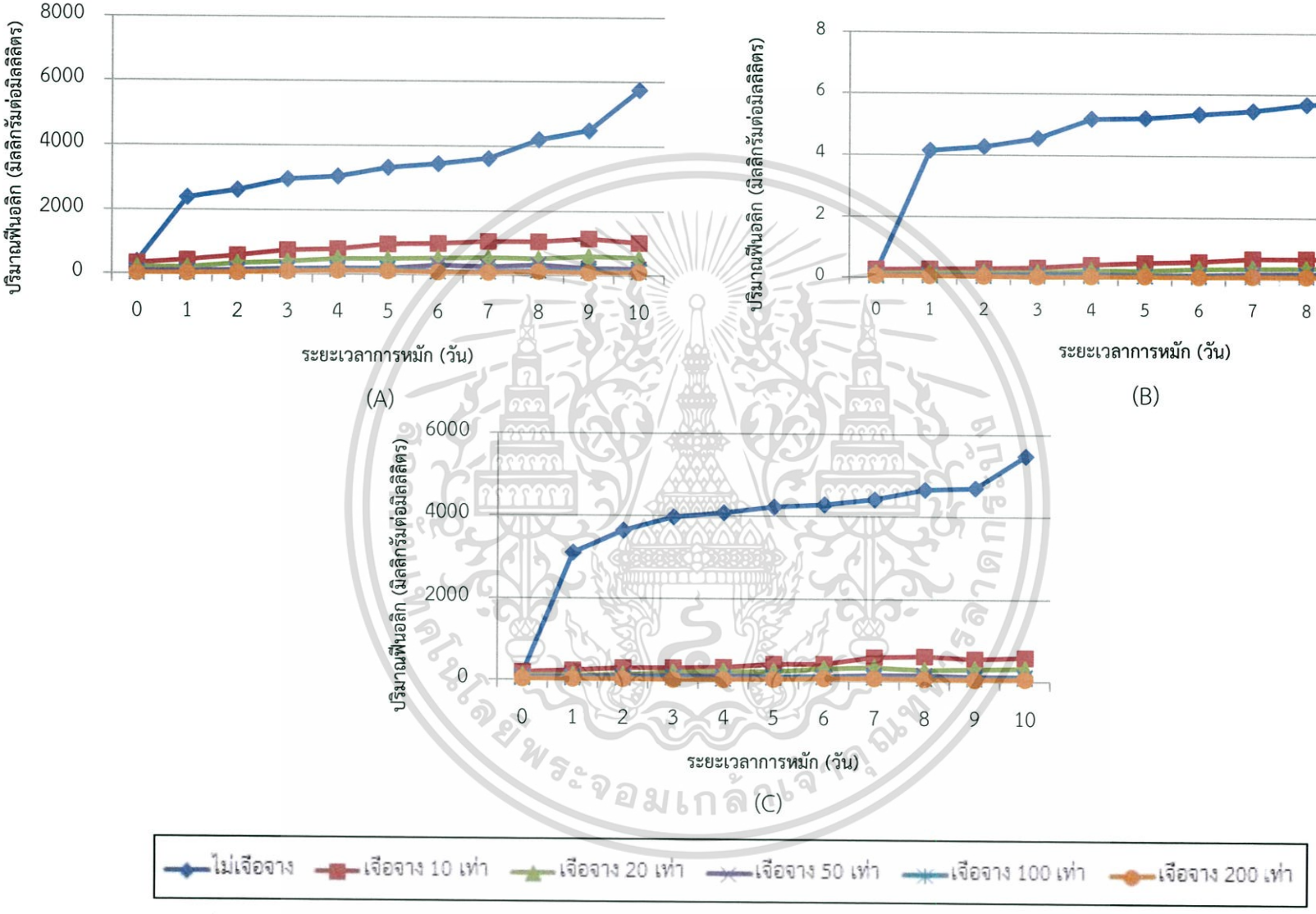
- ปริมาณฟีนอลิกแสดงในรูปค่าเฉลี่ย (Mean) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviations, SD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ
- ^{abc} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางที่ 4.5 ปริมาณฟีนอลิกในคอมบูชาจากการหมักชาอู่หลง ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน

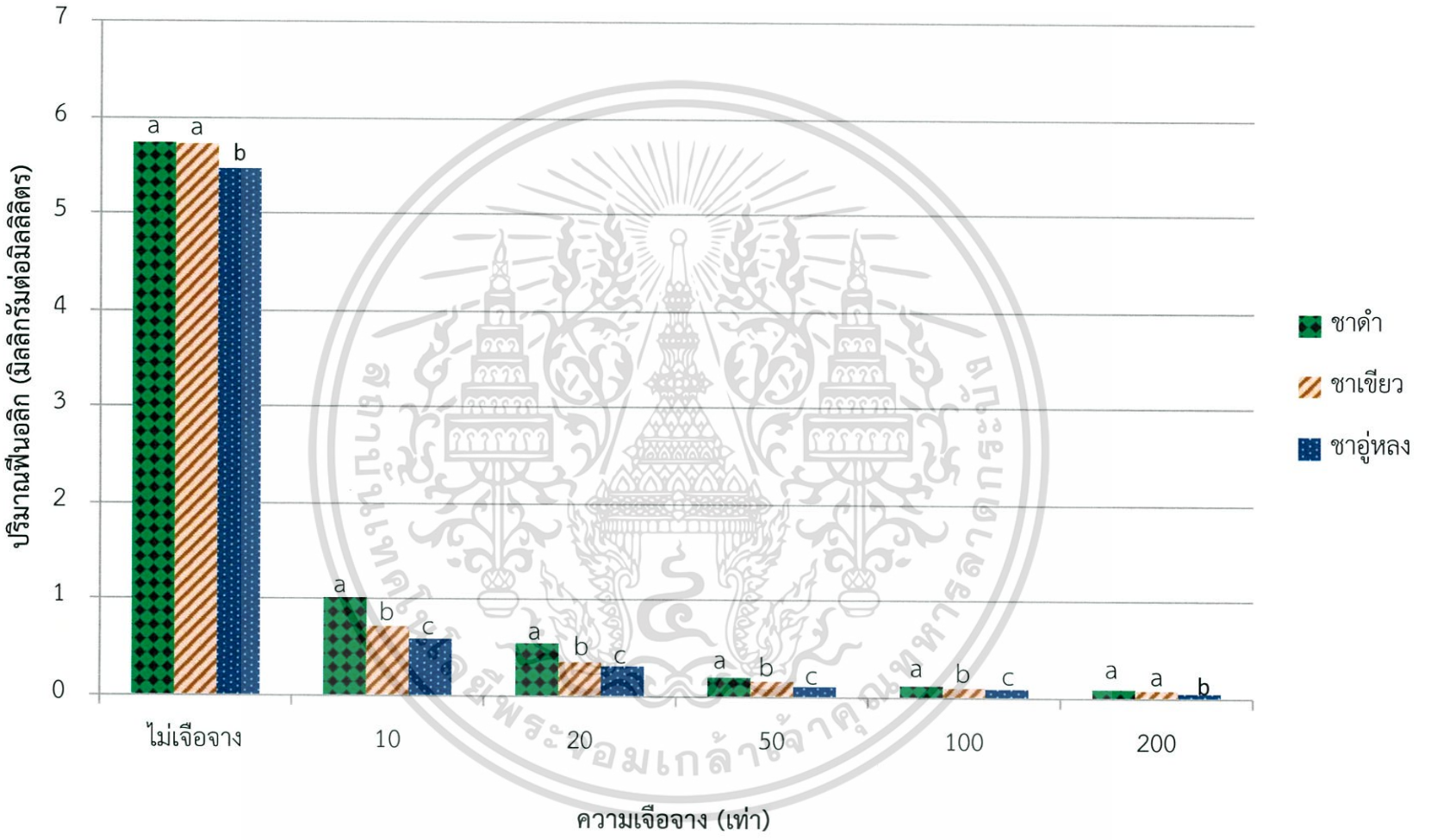
ระยะเวลาการหมัก (วัน)	ปริมาณฟีนอลิกในคอมบูชาจากการหมักชาอู่หลง (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)					
	ไม่เจือจาง	เจือจาง 10 เท่า	เจือจาง 20 เท่า	เจือจาง 50 เท่า	เจือจาง 100 เท่า	เจือจาง 200 เท่า
0	$0.15^{k} \pm 0.01$	$0.19^{i} \pm 0.00$	$0.10^{i} \pm 0.01$	$0.06^{g} \pm 0.00$	$0.04^{d} \pm 0.01$	$0.02^{de} \pm 0.00$
1	$3.11^{j} \pm 0.00$	$0.23^{h} \pm 0.00$	$0.11^{h} \pm 0.01$	$0.07^{f} \pm 0.00$	$0.04^{d} \pm 0.01$	$0.02^{e} \pm 0.00$
2	$3.64^{i} \pm 0.00$	$0.29^{g} \pm 0.01$	$0.12^{g} \pm 0.01$	$0.08^{e} \pm 0.00$	$0.04^{d} \pm 0.01$	$0.02^{de} \pm 0.01$
3	$3.96^{h} \pm 0.01$	$0.30^{f} \pm 0.01$	$0.19^{f} \pm 0.00$	$0.10^{cd} \pm 0.01$	$0.06^{c} \pm 0.01$	$0.01^{f} \pm 0.00$
4	$4.07^{g} \pm 0.01$	$0.31^{e} \pm 0.01$	$0.21^{e} \pm 0.00$	$0.10^{c} \pm 0.00$	$0.04^{d} \pm 0.01$	$0.02^{ef} \pm 0.01$
5	$4.22^{f} \pm 0.00$	$0.40^{d} \pm 0.01$	$0.22^{e} \pm 0.01$	$0.09^{d} \pm 0.01$	$0.07^{b} \pm 0.00$	$0.03^{d} \pm 0.00$
6	$4.28^{e} \pm 0.00$	$0.40^{d} \pm 0.00$	$0.30^{c} \pm 0.00$	$0.10^{c} \pm 0.00$	$0.08^{b} \pm 0.01$	$0.05^{ab} \pm 0.01$
7	$4.41^{d} \pm 0.01$	$0.58^{b} \pm 0.00$	$0.33^{a} \pm 0.00$	$0.15^{a} \pm 0.00$	$0.08^{a} \pm 0.01$	$0.06^{a} \pm 0.01$
8	$4.65^{c} \pm 0.00$	$0.60^{a} \pm 0.00$	$0.27^{d} \pm 0.00$	$0.15^{a} \pm 0.00$	$0.07^{b} \pm 0.00$	$0.05^{ab} \pm 0.00$
9	$4.69^{b} \pm 0.00$	$0.54^{c} \pm 0.01$	$0.30^{c} \pm 0.00$	$0.11^{b} \pm 0.01$	$0.07^{b} \pm 0.00$	$0.04^{c} \pm 0.00$
10	$5.47^{a} \pm 0.04$	$0.58^{b} \pm 0.00$	$0.31^{b} \pm 0.00$	$0.11^{b} \pm 0.00$	$0.09^{a} \pm 0.01$	$0.05^{bc} \pm 0.00$

หมายเหตุ

- ปริมาณฟีนอลิกแสดงในรูปค่าเฉลี่ย (Mean) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviations, SD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ
- ^{abc} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



รูปที่ 4.5 ปริมาณฟีนอลิกในคอมบูชาจากการหมัก (A) ชาดำ (B) ชาเขียว และ (C) ชาอู่หลง ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน



รูปที่ 4.6 เปรียบเทียบปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในคอมบูชาจากการหมักชาชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิห้อง ในวันที่ 10

4.2 การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีดีพีพีเอช (DPPH radical scavenging)

จากการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวีธีดีพีพีเอชของคอมบูชาจากชาทั้งสามชนิด พบว่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการหมัก และสูงสุดในวันสุดท้ายของการหมัก (วันที่ 10) และมีความแตกต่างทางสถิติกับการหมักในช่วงแรกของการหมัก (1 – 5 วัน) แสดงดังตารางที่ 4.6 – 4.8 จากการหมักคอมบูชาจากชาทั้งสามชนิด เมื่อเจือจางคอมบูชาที่ความเจือจาง 10 20 เท่า วิเคราะห์ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชของคอมบูชาทั้งสามชนิดมีค่าสูงมากเกิน 100% จึงได้ทำการเจือจางเพิ่มขึ้นเป็น 50 100 200 และ 500 เท่าของคอมบูชาจากชาทั้งสามชนิด พบว่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชจะลดลงตามความเจือจางที่เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบคอมบูชาจากชาทั้งสามชนิด พบว่าจากการหมัก 10 วัน คอมบูชาจากชาดำมีร้อยละการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชสูงกว่าชาเขียวและชาอู่หลงและมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงดังรูปที่ 4.8 ซึ่งผลงานวิจัยของ Jayabalan และคณะ (2008) ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของคอมบูชาระหว่างการหมักเป็นเวลา 18 วัน พบว่าค่าการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอช เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมัก และสูงสุดวันที่ 18 ของการหมัก ขณะที่การทดลองของ Theppakorn (2012) พบว่าคอมบูชาจากการหมักชาเขียวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชสูงกว่าชาดำ และชาอู่หลง เนื่องจากชาเขียวเป็นชาที่ไม่ผ่านการหมัก ชาอู่หลงเป็นชาที่หมักเพียงบางส่วน และชาดำเป็นชาที่หมักอย่างสมบูรณ์ ทำให้องค์ประกอบทางเคมีของชาเขียวส่วนใหญ่คล้ายใบชาสด ซึ่งมีปริมาณคาเทชินสูง ส่วนชาดำและชาอู่หลงซึ่งผ่านกระบวนการหมัก กระบวนการหมักทำให้เอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดสเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของคาเทชิน และเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน และจากการทดลองของ Nishidai และคณะ (2000) ทำการหมักน้ำส้มสายชูโดยแบคทีเรียที่ผลิตกรดอะซิติกโดยใช้สารตั้งต้นที่ต่างกัน ทำให้เห็นว่าการหมักน้ำส้มสายชูโดยใช้สารตั้งต้นที่อุดมไปด้วยกรดฟีนอลิก ส่งผลให้มีการกำจัดอนุมูลอิสระดีพีพีเอชสูงที่สุด

จากผลการทดลองที่ได้พบว่าจากการหมักคอมบูชาจากชาดำ ชาเขียว และชาอู่หลง มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมัก เนื่องจากสารทีรูบิริน (Thearubiqin) ในชาจะเกิดการสลายตัวให้สารที่มีโมเลกุลเล็กๆ ที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูง (Chu และ Chen, 2006)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชของชาหมักคอมบูชาจากการหมักชาดำที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชของชาหมักคอมบูชาจากชาดำ				
	ไม่เจือจาง	เจือจาง 50 เท่า	เจือจาง 100 เท่า	เจือจาง 200 เท่า	เจือจาง 300 เท่า
0	$104.14^{g} \pm 0.53$	$66.06^{h} \pm 0.99$	$52.44^{d} \pm 1.88$	$31.40^{h} \pm 0.33$	$13.74^{h} \pm 3.79$
1	$106.88^{f} \pm 0.18$	$70.17^{g} \pm 0.70$	$55.66^{c} \pm 0.20$	$34.86^{g} \pm 0.70$	$22.96^{g} \pm 0.72$
2	$107.07^{f} \pm 0.22$	$72.90^{f} \pm 0.72$	$55.81^{c} \pm 0.42$	$35.39^{g} \pm 0.83$	$23.44^{g} \pm 2.30$
3	$109.20^{e} \pm 0.21$	$73.39^{f} \pm 0.26$	$59.14^{b} \pm 2.42$	$35.17^{g} \pm 0.39$	$27.07^{f} \pm 0.00$
4	$109.33^{de} \pm 0.44$	$74.88^{e} \pm 1.01$	$67.77^{a} \pm 4.26$	$41.92^{f} \pm 2.55$	$32.31^{e} \pm 1.48$
5	$110.30^{d} \pm 1.28$	$76.14^{c} \pm 0.51$	$68.77^{a} \pm 0.67$	$45.50^{e} \pm 0.15$	$33.48^{de} \pm 1.27$
6	$112.78^{c} \pm 1.38$	$76.97^{cd} \pm 0.73$	$69.10^{a} \pm 0.32$	$49.21^{d} \pm 0.28$	$35.80^{cd} \pm 0.58$
7	$111.93^{c} \pm 0.19$	$77.30^{bc} \pm 0.28$	$69.17^{a} \pm 0.74$	$50.86^{cd} \pm 2.28$	$37.68^{c} \pm 0.16$
8	$114.19^{b} \pm 0.31$	$78.37^{ab} \pm 0.74$	$70.22^{a} \pm 0.84$	$51.22^{c} \pm 0.43$	$36.99^{c} \pm 1.27$
9	$114.97^{b} \pm 0.32$	$78.31^{ab} \pm 0.74$	$69.37^{a} \pm 1.09$	$56.02^{b} \pm 0.36$	$42.19^{b} \pm 1.80$
10	$117.05^{a} \pm 0.39$	$78.62^{a} \pm 0.00$	$67.59^{a} \pm 0.47$	$58.31^{a} \pm 0.62$	$47.42^{a} \pm 0.93$

หมายเหตุ

- ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชแสดงในรูปค่าเฉลี่ย (Mean) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviations, SD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ
- ^{abc} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชของชาหมักคอมบูชาจากการหมักชาเขียวที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชของชาหมักคอมบูชาจากชาเขียว				
	ไม่เจือจาง	เจือจาง 50 เท่า	เจือจาง 100 เท่า	เจือจาง 200 เท่า	เจือจาง 300 เท่า
0	$100.00^{g} \pm 1.78$	$53.98^{f} \pm 0.00$	$49.60^{f} \pm 1.97$	$29.39^{f} \pm 1.61$	$12.40^{e} \pm 3.07$
1	$100.09^{g} \pm 2.54$	$58.73^{e} \pm 0.21$	$52.30^{e} \pm 0.21$	$29.29^{f} \pm 2.28$	$17.47^{d} \pm 1.26$
2	$103.06^{f} \pm 0.26$	$61.82^{d} \pm 0.75$	$53.75^{e} \pm 1.30$	$31.35^{ef} \pm 0.00$	$19.07^{cd} \pm 3.77$
3	$106.65^{e} \pm 1.37$	$68.03^{c} \pm 0.81$	$53.06^{e} \pm 0.91$	$32.11^{ef} \pm 0.50$	$19.41^{cd} \pm 0.73$
4	$106.89^{e} \pm 0.24$	$72.44^{b} \pm 3.79$	$56.87^{d} \pm 0.24$	$36.38^{de} \pm 1.33$	$21.68^{bc} \pm 2.39$
5	$107.67^{de} \pm 0.11$	$74.09^{ab} \pm 0.96$	$58.26^{d} \pm 0.42$	$38.75^{cd} \pm 2.35$	$22.28^{bc} \pm 0.86$
6	$107.40^{de} \pm 0.75$	$74.13^{ab} \pm 0.66$	$60.06^{c} \pm 0.25$	$41.98^{bc} \pm 8.57$	$23.81^{b} \pm 1.29$
7	$109.29^{cd} \pm 0.43$	$74.24^{ab} \pm 2.63$	$60.62^{c} \pm 0.70$	$40.06^{cd} \pm 2.52$	$25.32^{b} \pm 1.79$
8	$110.67^{bc} \pm 0.48$	$74.27^{ab} \pm 1.16$	$62.25^{ab} \pm 0.85$	$41.29^{bcd} \pm 0.85$	$25.20^{b} \pm 2.27$
9	$112.05^{ab} \pm 0.70$	$74.88^{ab} \pm 1.72$	$61.13^{bc} \pm 1.15$	$45.14^{ab} \pm 0.78$	$29.64^{a} \pm 2.50$
10	$113.77^{a} \pm 0.80$	$76.74^{a} \pm 1.30$	$63.35^{a} \pm 0.47$	$48.33^{a} \pm 1.24$	$31.70^{a} \pm 2.58$

หมายเหตุ

- ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชแสดงในรูปค่าเฉลี่ย (Mean) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviations, SD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ
- ^{abc} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

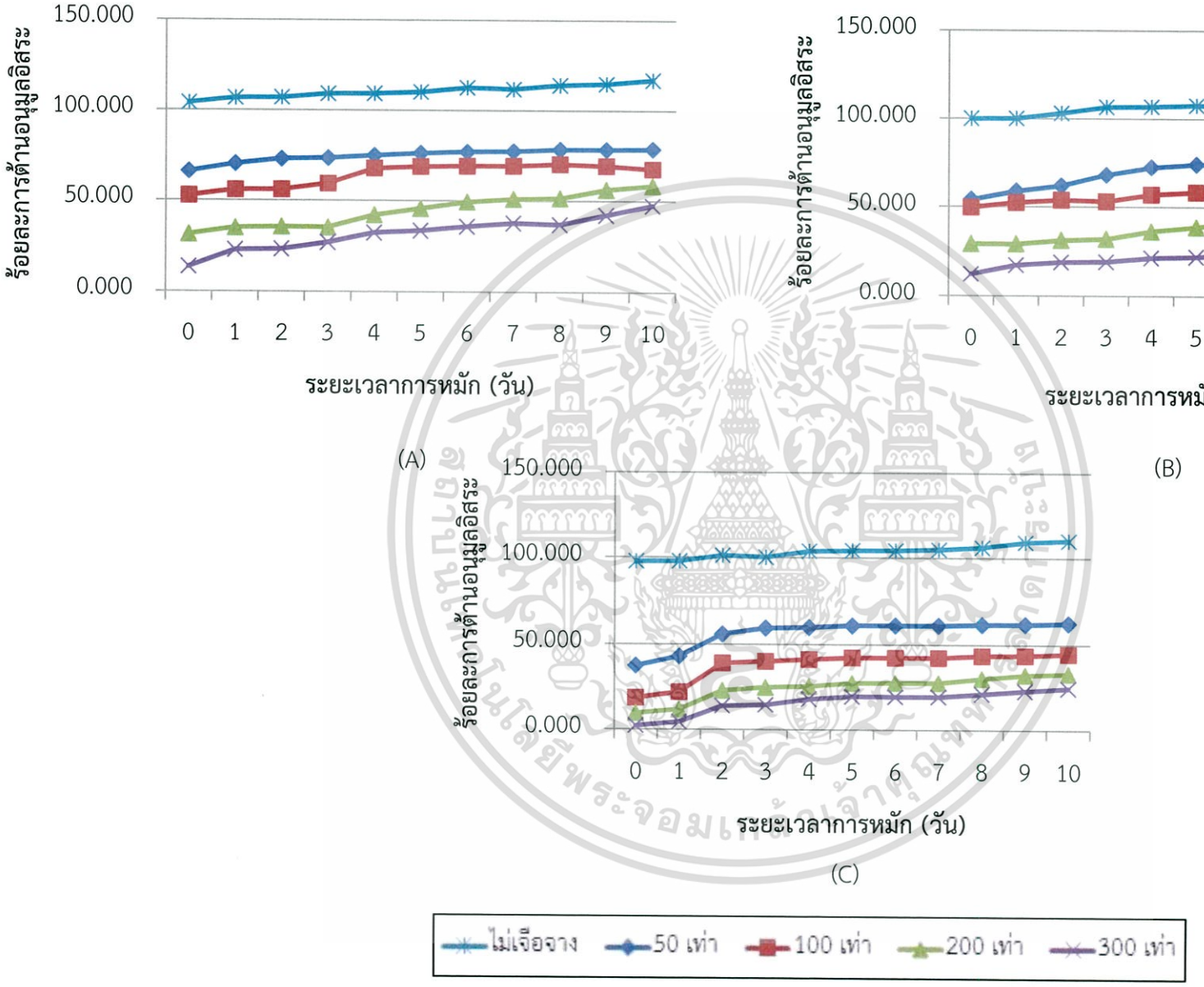
ตารางที่ 4.8 ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชของชาหมักคอมบูชาจากการหมักชาอู่หลงที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชของชาหมักคอมบูชาจากชาอู่หลง				
	ไม่เจือจาง	เจือจาง 50 เท่า	เจือจาง 100 เท่า	เจือจาง 200 เท่า	เจือจาง 300 เท่า
0	$97.51^{f} \pm 0.38$	$37.39^{d} \pm 3.90$	$18.55^{f} \pm 1.77$	$9.49^{h} \pm 0.14$	$2.19^{e} \pm 1.23$
1	$97.67^{f} \pm 0.23$	$42.90^{c} \pm 1.49$	$21.95^{e} \pm 0.51$	$11.72^{g} \pm 0.81$	$4.38^{e} \pm 2.23$
2	$101.11^{e} \pm 0.79$	$55.92^{b} \pm 0.69$	$38.99^{d} \pm 4.46$	$22.83^{f} \pm 1.32$	$13.92^{d} \pm 1.14$
3	$100.09^{e} \pm 0.99$	$59.41^{a} \pm 2.10$	$40.07^{cd} \pm 1.14$	$24.75^{ef} \pm 1.92$	$14.54^{d} \pm 1.38$
4	$103.75^{d} \pm 0.12$	$59.78^{a} \pm 0.36$	$41.26^{bcd} \pm 1.08$	$25.50^{de} \pm 0.13$	$17.97^{c} \pm 0.72$
5	$104.21^{cd} \pm 0.63$	$60.98^{a} \pm 0.56$	$42.36^{abc} \pm 1.21$	$27.42^{cd} \pm 1.09$	$19.54^{c} \pm 0.41$
6	$104.23^{cd} \pm 0.27$	$61.00^{a} \pm 0.85$	$42.29^{abcd} \pm 0.58$	$27.58^{c} \pm 1.32$	$19.49^{c} \pm 1.80$
7	$104.86^{c} \pm 0.97$	$61.33^{a} \pm 1.70$	$43.03^{abc} \pm 2.18$	$28.18^{c} \pm 1.44$	$19.30^{c} \pm 1.48$
8	$106.22^{b} \pm 0.52$	$61.72^{a} \pm 1.06$	$43.56^{ab} \pm 1.22$	$30.27^{b} \pm 1.27$	$21.19^{bc} \pm 1.13$
9	$109.37^{a} \pm 0.73$	$61.84^{a} \pm 2.52$	$43.77^{ab} \pm 1.09$	$32.39^{a} \pm 0.95$	$22.91^{ab} \pm 2.79$
10	$110.24^{a} \pm 0.20$	$62.40^{a} \pm 0.82$	$44.72^{a} \pm 2.62$	$33.19^{a} \pm 0.79$	$24.54^{a} \pm 4.14$

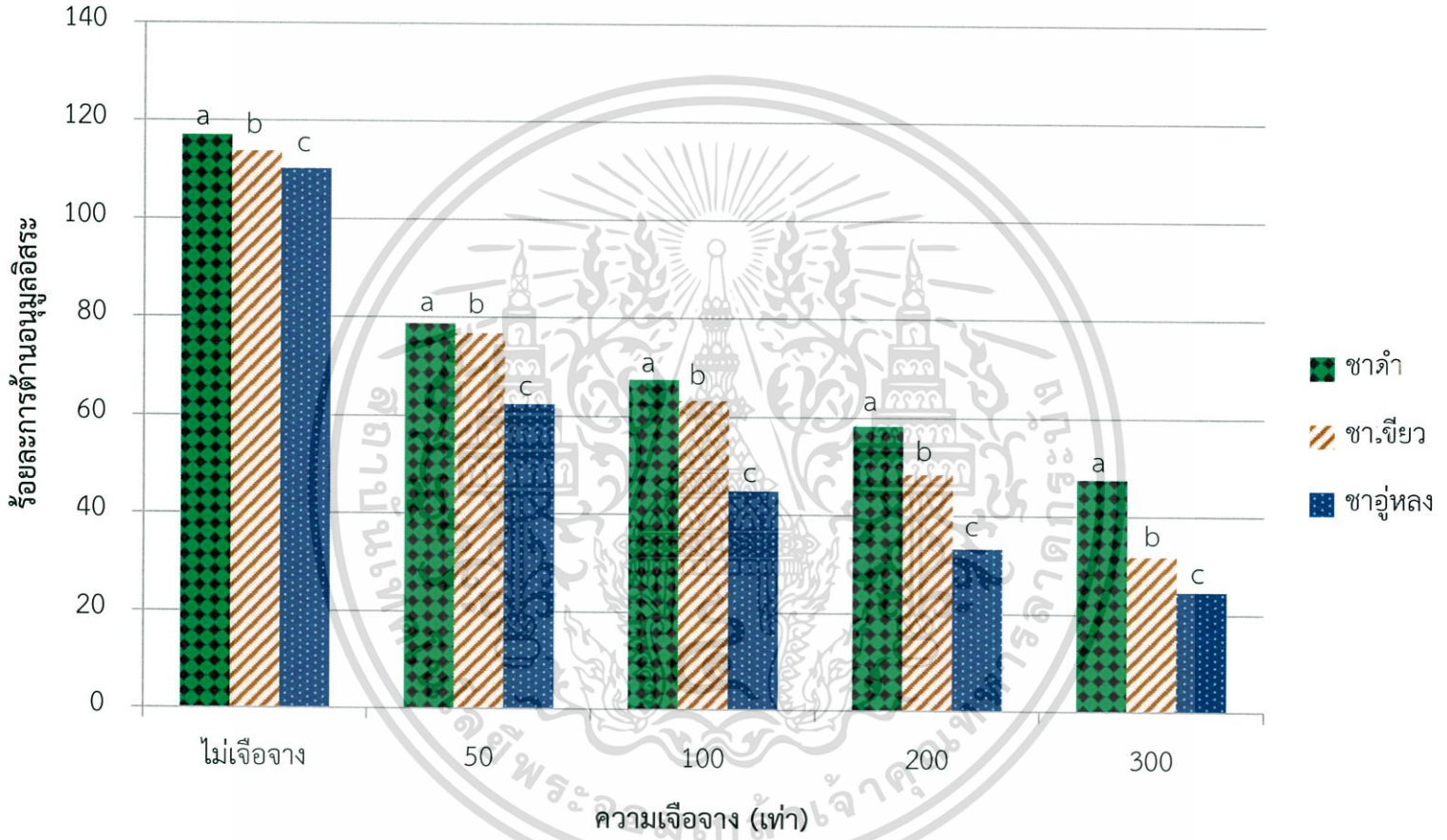
หมายเหตุ

- ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชแสดงในรูปค่าเฉลี่ย (Mean) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviations, SD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ
- ^{abc} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

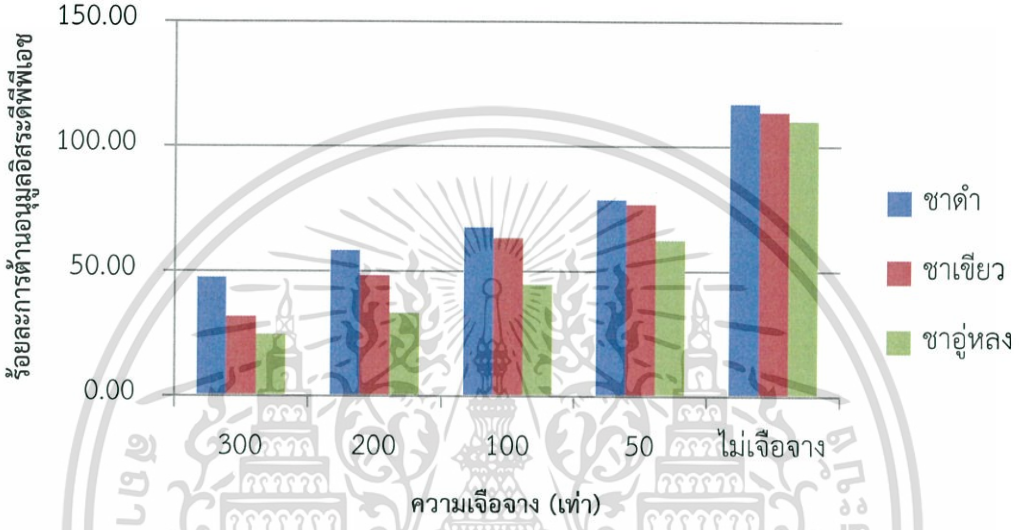


รูปที่ 4.7 ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชของชาหมักคอมบูชา (A) ชาดำ (B) ชาเขียว และ (C) ชาอู่หลง ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน



รูปที่ 4.8 เปรียบเทียบร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชของชาหมักคอมบูชาชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิห้อง ในวันที่ 10

จากค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชในวันสุดท้ายของการหมักคอมบูชา ค่า IC_{50} ของชาดำและชาเขียวที่ความเจือจาง 200 เท่า มีร้อยละการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอช 58.31 ± 0.62 และ 48.33 ± 1.24 ตามลำดับ ชาอู่หลงที่ความเจือจาง 100 เท่า มีร้อยละการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอช 44.72 ± 2.62 แสดงดังรูปที่ 4.9



รูปที่ 4.9 แสดงร้อยละการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชในวันที่ 10 ของการหมักคอมบูชาจากชาดำ ชาเขียว และ ชาอู่หลง ในวันที่ 10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการหมักคอมบูชาจากชาดำ ชาเขียว และชาอู่หลง ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน เก็บตัวอย่างทุกวันวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติก พีเอช ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอช พบว่าคอมบูชาทั้งสามชนิดมีพีเอชลดลงตลอดระยะเวลาการหมัก ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติกจะเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการหมักเช่นกัน โดยเฉพาะคอมบูชาจากชาดำมีปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติกสูงกว่าชาเขียวและชาอู่หลงตามลำดับ ในวันสุดท้ายของการหมัก (10 วัน) มีค่าร้อยละ 2.41 ± 0.00 2.20 ± 0.07 และ 1.94 ± 0.01 ตามลำดับ

การเปลี่ยนแปลงปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในคอมบูชาทั้งสามชนิดจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมักเช่นกัน โดยคอมบูชาจากชาดำมีปริมาณฟีนอลิกสูงกว่าชาเขียวและชาอู่หลง ในวันสุดท้ายของการหมัก (10 วัน) คอมบูชาจากชาดำ ชาเขียวและชาอู่หลงมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด 5.74 ± 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 5.73 ± 0.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 5.47 ± 0.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีดีพีพีเอชของคอมบูชาจากชาทั้งสามชนิด จะเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการหมักและสูงสุดในวันสุดท้ายของการหมัก (10 วัน) และคอมบูชาจากชาดำมีร้อยละการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชสูงกว่าชาเขียวและชาอู่หลง ตามลำดับ และมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ในวันสุดท้ายของการหมัก (10 วัน) ค่า IC_{50} คอมบูชาจากชาดำและชาเขียวที่ความเจือจาง 200 เท่า มีร้อยละการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอช 58.31 ± 0.62 และ 48.33 ± 1.24 ตามลำดับ ชาอู่หลงที่ความเจือจาง 100เท่า มีร้อยละการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอช 44.72 ± 2.62

จะเห็นได้ว่าการหมักคอมบูชาจากชาดำเป็นระยะเวลา 10 วัน จะทำให้คอมบูชาที่ได้มีปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติกสูง ปริมาณฟีนอลิกสูงและมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชสูงกว่าคอมบูชาที่ได้จากชาเขียว และชาอู่หลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

นงลักษณ์และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2552. **จุลชีววิทยาทั่วไป**. พิมพ์ครั้งที่7. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เสาวนีย์ จักรพิทักษ์. 2542. **หลักโภชนาการปัจจุบัน.** กรุงเทพฯ : ไทยวัฒนาพานิชจำกัด.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2558. **เทคนิคสเปกโตรสโคปที่สำคัญในการศึกษาโมเลกุลชีวอนินทรีย์**. [online]. เข้าถึงได้จาก : http://pioneer.netserv.chula.ac.th/~spornthe/methods_6per_page.pdf.

เจนจิรา จิรัมย์และประสงค์ สีหานาม. 2554. **อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ : แหล่งที่มาและกลไกการเกิดปฏิกิริยา.** วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยราชภัฏกาฬสินธุ์ ปีที่ 1 ฉบับที่ 1 พ.ค.-ส.ค. 2554. [Online]. เข้าถึงได้จาก : http://www.kpi.msu.ac.th/upload/ag_tor_ref_bymst/ag_9_in_2.1.2.1_6_377().pdf.

ฉัตรชัย ศรีบัณฑิต. 2556. **การล้างสารพิษมีประโยชน์จริงหรือ**. [Online]. เข้าถึงได้จาก : http://www.absolute-health.org/thai/Q-A-th-01.htm.

นงนภัส ดวงดี. 2551. **สารต้านอนุมูลอิสระ.** บทความกรมวิทยาศาสตร์บริการ. [Online]. เข้าถึงได้จาก : http://www.dss.go.th/dssweb/starticles/files/cp_2_2551_Antioxidant.pdf.

พนารัตน์ มอญใต้. 2559. **เรื่องน่ารู้เกี่ยวกับจุลินทรีย์ที่เป็นมิตร : โปรไบโอติก**. [online]. เข้าถึงได้จาก : http://lib3.dss.go.th/fulltext/dss_j/2555_189_60_p13-15.pdf.

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และ นิธิยา รัตนาปนนท์. 2559. **ยีสต์**. [online]. เข้าถึงได้จาก : http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/0555/yeast-%E0%B8%A2%E0%B8%B5%E0%B8%AA%E0%B8%95%E0%B9%8C.

พรรัตน์ สินชัยพานิช. 2558. **เครื่องดื่มชาหมัก**. [online]. เข้าถึงได้จาก : https://Mekongcuisine.wordpress.com/งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 2558. **บทที่ 2 ทบทวนเอกสาร**. [online]. เข้าถึงได้จาก : http://archive.lib.cmu.ac.th/full/T/2551/biol0451tp_ch2.pdf.

โรงงานอาหารสัตว์ เจบีเอฟ จำกัด. 2553. **สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)**. [online]. เข้าถึงได้จาก : http://www.jbf.co.th/index.php/2012-11-13-08-45-03/81-antioxidant#.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิไลพร ปองเพียร. 2551. **การศึกษาคุณสมบัติของสารต้านอนุมูลอิสระและสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในฟักแม้ว**. [online]. เข้าถึงได้จาก : http://research.pcru.ac.th/rdb/pro_data/files/5101023.pdf.

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. 2558. **Probiotic & Prebiotic**. [online]. เข้าถึงได้จาก : http://www.tistr.or.th/bsd/ProBiotic.html.

สยามเคมี. 2558. **วิตามินอี (Vitamin E)**. [online]. เข้าถึงได้จาก : http://www.siamchemi.com/วิตามินอี.

สำนักการแพทย์ทางเลือก กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข. 2559. **โพรไบโอติก จุลินทรีย์ทางเลือกเพื่อสุขภาพ**. [online]. เข้าถึงได้จาก : http://thaicamdb.info/Downloads/PDF/%E0%B9%82%E0%B8%9E%E0%B8%A3%E0%B9%84%E0%B8%9A%E0%B9%82%E0%B8%AD%E0%B8%95%E0%B8%B4%E0%B8%8119.9.13.pdf.

อัญชนา เจนวิถีสุข. 2544. **การตรวจหาชนิดและบ่งชี้ชนิดสารต้านอนุมูลอิสระจากผักพื้นบ้านและสมุนไพรไทย**. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2545. [Online]. เข้าถึงได้จาก : http://ss.lib.cmu.ac.th/digital_collection/etheses/fulltext.php?id=7650.

Antioxidant Herb. 2554. **วิตามินอี ต้านอนุมูลอิสระ**. [online]. เข้าถึงได้จาก : http://antioxidantherb.blogspot.com/2011/07/vitamin-e.html.

Brown, E. 2006. **EDTA Chelation Therapy**. [Online]. เข้าถึงได้จาก : http://healthpsych.psy.vanderbilt.edu/EDTAChelation.htm.

Bruce, N.A. Mark, K.S. and Tory, M.H. 1993. **Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging**. [Online]. เข้าถึงได้จาก : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC47258.

Kaidang. 2554. **คอมบูชา Kombucha**. [online]. เข้าถึงได้จาก : http://yaamata.blogspot.com/2011/10/kombucha.html.

Lauren, A.T. 2008. **Antioxidant deficiencies in hospitalized dogs and cats**. World Small Animal Veterinary Association. [Online]. เข้าถึงได้จาก : http://www.vin.com/proceedings/ Proceedings.plx?CID=WSAVA2008&PID=24064&O=Generic.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

madi kombucha. 2558. **ประวัติความเป็นมา**. [online]. เข้าถึงได้จาก : http://www.madikombucha.com.

Aloulou, A. Hamden, K. Elloumi, D. Ali, M. B. Hargafi, K. Jaouadi, B. Ayadi, F. Elfeki, A. and Ammar, E. 2012. **Hypoglycemic and antilipidemic properties of kombucha in alloxan-induced diabetic rats.** *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 12 : 12-63.

Bast, A., Haeren, G. and Doelmen, C. 1991. **Oxidants and antioxidants: state of art.** *American Journal of Medicine*. 91 : 2-3.

Bielecka, M. 2007. **Probiotics in food**. Edited by Sikorski, Zozislaw E. In Chemical and functional properties of food components. *3rd ed. Florida : CRC Press*. 413-426.

Blois, M.S. 1958. **Antioxidant determinations by the use of stable free radical.** *Nature*. 181 : 1199-1200.

Chakravorty, S. Bhattacharya, S. Chatzinotas, A. Chakraborty, W. Bhattacharya, D. and Gachhui,R. 2016. **Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics.** *Food Microbiology*. 220 : 63-72.

Chen, C., and Liu, B.Y. 2000. **Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation.** Journal of Applied Microbiology. 89(5) : 834-839.

Chuang, L., Wu HG., Pai, C., Hsieh, PS., Tsai, JJ., Yen, JH., and Lin, MY. 2007. **Heat-killed cells of lactobacilli skew the immune response toward T helper 1 polarization in mouse splenocytes and dendritic cell-treated T cells.** *Journal Agric Food Chem*. 55 : 11080-11086.

Chu, S.C., and Chen, C. 2006. **Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of kombucha.** *Food Chemistry*. 98 : 502-507.

Dufresne, C., and Farnworth, E. 2000. **Tea, Kombucha, and health: a review.** *Food Research International*. 33 : 409–421.

Fu, C., Yan, F., Cao, Z., Xie, F., and Lin, J. 2014. **Antioxidant activities of kombucha prepared from three different substrates and changes in content of probiotics during storage.** *Food Sci. Technol*. 34(1) : 123-126.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Barry, R.G. 2011. **Probiotics and health : from history to future.** Edited by Wolfgang, K. and Seppo, S. In Probiotics and health claims. *Iowa : Wiley- Blackwell*. 1-16.

Greenwalt, C.J., Steinkraus, K.H., and Ledford, R.A. 1998. **Determination and characterization of the antimicrobial activity of the fermented tea kombucha.** *LWT- Food Science and Technology*. 31(3) : 291-296.

Greenwalt, C.J., Steinkraus, K.H., and Ledford, R.A. 2000. **Kombucha, the fermented tea : Microbiology, composition and claimed health effects.** *Journal of Food Protection*. 63 : 976-981.

Gressier, B., Lebegue, S., and Brunet, C. 1994. **Pro-oxidant properties of methotrexate evaluation and prevention by an antioxidant drug.** *Archiv der Pharmazie-Chemistry in Life Science*. 49 : 679-681.

Halliwell, B., and Gutteridge, J.M. 1995. **The definition and measurement of antioxidants in biological systems.** *Free Radical Biology & Medicine*. 18(1) : 125-126.

Hou, W.C., Lee, M.H., Chen, H.J., Liang, W.L., Han, C.H., Liu, Y.W., and Lin, Y.H. 2001. **Antioxidant activity in vitro.** *Planta Medica*. 68 : 1072-1076.

Howell, N.K., and Saeed, S. 1999. **The effect of antioxidants on the production of lipid oxidation products and transfer of free radicals in oxidized lipid-protein systems.** In T.K. Basu, N.J. Temple and M.L. Garg (eds.), *Antioxidants in human health and disease*. 43-54.

Jayabalan, R., Subathradevi, P., Marimuthu, S., Sathishkumar, M., and Swaminathan, K. 2008. **Changes in free-radical scavenging ability of kombucha tea during fermentation.** *Food Chemistry*. 109 : 227-234.

Lee, Y.H., Choo, C., Watawana, M.I., Jayawardena, N., and Waisundara, V.Y. 2014. **Kombucha 'tea fungus' enhances the tea polyphenol contents, antioxidant activity and alpha-amylase inhibitory activity of five commonly consumed teas.** *Fungtional foods*. 1-8.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Iguchi, M., Yamanaka, S., and Budhiono, A. 2000. **Bacterial cellulose - a masterpiece of nature's arts.** *J. Mater. Science.* 35 : 261-270.

LIU, C.H., HSU, W.H., LEE, F.L., and LIAO, C. C. 1996. **The isolation and identification of microbes from a fermented tea beverage, Haipao, and their interactions during Haipao fermentation.** *Food Microbiology.* 13 : 407-415.

Loncar, E., Djuric, M., Malbasa, R., Kolarov, L.J., and Klasnja, M. 2006. **Influence of working conditions upon kombucha conducted fermentation of black tea.** *Food and Bioproducts Processing.* 84(C3) : 186–192.

Maeda, N., Nakamura, R., Hirose, Y., Murosaki, S., Yamamoto, Y., Kase ,T., and Yoshikai, Y. 2009. **Oral administration of heat-killed Lactobacillus plantarum L-137 enhances protection against influenza virus infection by stimulation of type I interferon production in mice.** *Int Immunophar.* 9 : 1122-1125

Malbasa, R., Loncar, E., and Djuric, M. 2008. **Comparison of the products of Kombucha fermentation on sucrose and molasses.** *Food Chemistry.* 106(3) : 1039-1045.

Malbasa, R., Loncar, E., Vitas, J., and Canadanovic-Brunet, J.M. 2011. **Influence of starter cultures on the antioxidant activity of kombucha beverage.** *Food Chemistry.* 127(4) : 1727-1731.

Nan, L., Russell, WM., Douglas-escobar, M., Hauser, N. Lopez., and M. Neu, J. 2009. **Live and heat-killed *Lactobacillus rhamnosus* GG: effects on proinflammatory and anti-inflammatory cytokines/chemokines in gastrostomy-fed infant rats.** *Pediatr Res.* 66 : 203-207.

Nishidai. S., Nakamura. Y., Torikai. K., Yamamoto. M., Ishihara. N., Mori. H., Ohigashi. H.K., **A traditional vinegar produced from unpolished rice, suppresses lipid peroxidation *in vitro* and in mouse skin.** *Biosci Biotechnol Biochem.* 64 : 1909-14.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ohkawa, H., Ohishi N., and Yagi, K. 1979. **Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction.** *Annals of Biochemistry*. 1979 (95) : 351-358.

Pokorny, J., Yanishlieva, N., and Gordon, M. 2001. **Antioxidants in food : practical applications.** *New York: CRC Press*. 380.

Ross, P., Mayer, R., and Benziman, M. 1991. **Cellulose biosynthesis and function in bacteria.** *Microbiol.* Rev 55 : 35–58.

Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., and Paganga, G. 1996. **Structure antioxidant activity relationship of flavonoid and phenolic acid.** *Free Radical Biology and Medicine*. 20 : 953-956.

Sanchez-Moreno, C., Jimenez-Escria, A., and Saura-Calixto, J. 2000. **Study of low density lipoprotein oxidizability indexes to measure the antioxidant activity of dietary polyphenols.** *Nutr. Res.* 20 (7) : 941-953.

Katja, S. 2006. **Development of probiotic food ingredients.** Edited by Mohamed, A., Ipek, G., and Vijay, J.K. In Probiotics in food safety and human Health. *Florida : CRC Press*. 35-55.

Spencer, J.P., Jenner, A., Aruoma, O.I., Evans, P.J., Kaur, H., Dexter, D.T., Jenner, P., Lees, A.J., Marsden, D.C., and Halliwell, B. 1994. **Intense oxidative DNA damage promoted by L-DOPA and its metabolites implications for neurodegenerative disease.** *FEBS Lett*. 353 : 246-250.

Stankova, L., Gerhardt, N.B., Nagal, L., and Bigley, H.R. 1975. **Ascorbate and phagocyte function.** *Infect. Immunol*. 12(2) : 252-256.

Teoh, A.L., Heard, G., and Cox, J. 2004. **Yeast ecology of kombucha fermentation.** In. *J. Food Microbiol.* 95 : 119-126.

Theppakorn, T. 2012. **Tea (Camellia sinensis L.): Manufacturing and Chemical Compositions from Fermentation.** *Burapha Sci. J.* 2 : 189-196.

Tzu-Ying Sun. Jia-Shiun Li. and Chinshuh Chen. 2015. **Effects of blending wheatgrass juice on enhancing phenolic compounds and antioxidant**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

activities of traditional kombucha beverage. *food and drug analysis.* 23 : 709 -718.

Valacchi, G., Pagnin, E., Corbacho, A.M., Olano, E., Davis, P.A., Packer, L., and Cross, C.E. 2004. **In vivo ozone exposure induces antioxidant stress-related responses in murine lung and skin.** *Free Radical Biology and Medicine.* 36 : 673-681.

Voest, E.E., Vreugdenhil, G., and Mark, J. 1994. **Iron-chelating agents in non-iron overload condition.** *Annals of Internal Medicine.* 120 : 490-499.

Yang, Z., Ji, B., Zhou, F., Li, B., Luo, Y., Yang, L., and Li, T. 2009. **Hypocholesterolemic and antioxidant effects of kombucha tea in high-cholesterol fed mice.** *Science of Food and Agriculture.* 89(1) : 150-156.

[online]. เข้าถึงได้จาก : http://www.watkhaosukim.com/sara/download/03_kombucha.pdf. (11 ตุลาคม 2558)

[online]. เข้าถึงได้จาก : http://teainstitutemfu.com/main/blog/องค์ประกอบทางเคมี. (11 ตุลาคม 2558)

[online]. เข้าถึงได้จาก : ttp://www.kpi.msu.ac.th/upload/ag_tor_ref_bymst/ag_9_in_2.1.2.1_6_377().pdf. (11 ตุลาคม 2558)

[online]. เข้าถึงได้จาก : http://202.28.24.44/e_books/602122/Elearning%20WORD/%BA%B7%B7%D5%E8%203%20%BA%B7%BA%D2%B7%A8%D8%C5%D4%B9%B7%C3%D5%C2%EC.doc. (11 ตุลาคม 2558)

[online]. เข้าถึงได้จาก : https://www.google.co.th/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwiFkaPd5KDKAhVHUY4KHZfmB9kQFggaMAA&url=http%3A%2F%2Fweb.yru.ac.th%2F~dolah%2Fnotes%2F4034605-2-48%2FMM-12%2FMM_40465206612.doc&usg=AFQjCNF2nWCpfCpDM0bVjuOMCgb6CpzecA&sig2=a5u4ehD4MzOkmVGY7rJEQQ&bvm=bv.111396085,d.c2E. (14 ธันวาคม 2558)

[online]. เข้าถึงได้จาก : http://drkosol.yolasite.com/type-of-yeast.php. (15 ธันวาคม 2558)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมี

1. โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล

   ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 กรัม ในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

2. โซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 2

   ละลายโซเดียมคาร์บอเนต 2 กรัม ในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

3. สารละลายดีพีพีเอชความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์

   ละลายดีพีพีเอช 0.0035 กรัม ใน absolute ethanol และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วย absolute ethanol

4. ฟีนอล์ฟทาลีน

   ละลายฟีนอล์ฟทาลีน 0.5 กรัม ในเอทิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ทางเคมีและเครื่องมือวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดโดยวิธี Folin-Ciocalteu Colorimetric Method

สารเคมี

1. สารละลายโฟลิน (Folin reagent) ความเข้มข้นร้อยละ 50 ปริมาตรต่อปริมาตร
2. สารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก

วิธีการเตรียมสารละลาย

1. สารละลายโฟลิน (folin reagent) ความเข้มข้นร้อยละ 50 ปริมาตรต่อปริมาตร
   - สารละลายโฟลิน 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น
2. สารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก
   - ชั่งกรดแกลลิก 0.01 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ได้สารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
   - ชั่งกรดแกลลิก 0.012 กรัม และ 0.014 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ได้สารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกความเข้มข้น 1200 และ 1400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ
   - เจือจางสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกที่ได้ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้น้ำกลั่นตามตารางที่ ข-1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข-1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก

ความเข้มข้นสารละลายมาตฐาน กรดแกลลิก (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาตรสารละลายมาตรฐาน กรดแกลลิก (มิลลิลิตร)	น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)
200	2	8
400	4	6
600	6	4
800	8	2
1000	10	-

วิธีการวิเคราะห์

1. การทำกราฟมาตรฐาน

1.1 สารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกความเข้มข้น 200, 400, 600, 800, 1000, 1200 และ 1400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

1.2 ปิเปตสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกแต่ละความเข้มข้นใส่ในหลอดทดลอง ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร

1.3 ปิเปต 2% โซเดียมคาร์บอเนตปริมาตร 2 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที

1.4 เติมสารละลาย Folin-ciocalteu reagent ความเข้มข้นร้อยละ 50 ปริมาตรต่อ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที

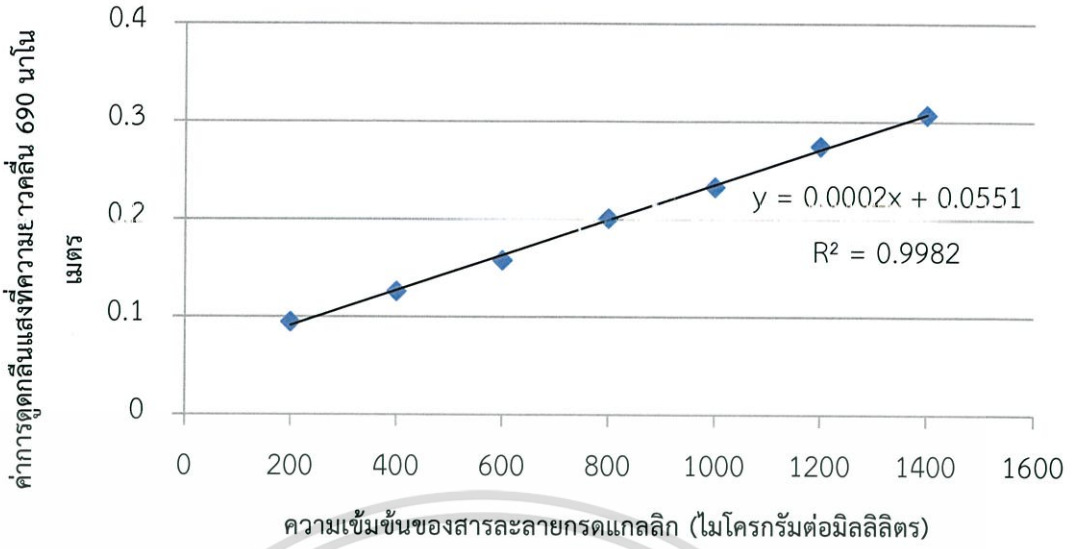
1.5 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 690 นาโนเมตร ด้วย 96-well microplate reader ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ได้กราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกตามรูปที่ ข-1

2. การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด

หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดจากกราฟมาตรฐาน (หาค่า x) โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาแทนในค่า y

จากสมการในรูปที่ ข-1 คือ $y = 0.0002x + 0.0551$ จะได้ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด หน่วยเป็นไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

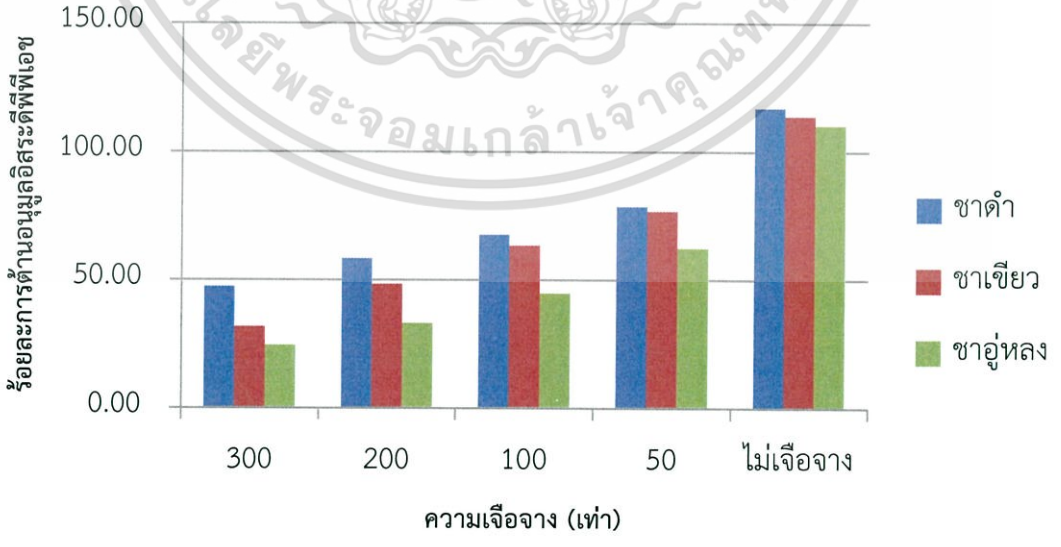
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ข-1 กราฟมาตรฐานกรดแกลลิกโดยวิธี Folin-Ciocalteu Colorimetric Method ที่ความยาวคลื่น 690 นาโนเมตร

3. การหาค่า IC_{50}

จากค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชในวันสุดท้ายของการหมักคอมบูชา ค่า IC_{50} ของชาดำและชาเขียวที่ความเจือจาง 200 เท่า มีร้อยละการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอช 58.31 ± 0.62 และ 48.33 ± 1.24 ตามลำดับ ชาอู่หลงที่ความเจือจาง 100 เท่า มีร้อยละการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอช 44.72 ± 2.62



รูปที่ ข-2 แสดงร้อยละการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชในวันที่ 10 ของการหมักคอมบูชาจากชาดำ ชาเขียว และชาอู่หลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ข้อมูลดิบ

ตารางที่ ค-1 ค่าพีเอชจากการหมักชาชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	พีเอชของน้ำหมัก								
	ชาดำ			ชาเขียว			ชาอู่หลง		
	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD
0	3.50	3.48	0.02	3.38	3.39	0.01	3.38	3.34	0.05
	3.46			3.40			3.35		
	3.48			3.38			3.28		
1	3.17	3.14	0.03	3.02	3.03	0.04	3.01	2.99	0.03
	3.13			3.08			3.00		
	3.12			3.00			2.96		
2	2.95	2.97	0.03	2.90	2.94	0.08	2.97	2.94	0.03
	3.00			3.03			2.93		
	2.97			2.90			2.91		
3	2.96	2.93	0.03	2.83	2.81	0.03	2.81	2.79	0.02
	2.91			2.82			2.79		
	2.91			2.78			2.78		
4	2.94	2.91	0.04	2.81	2.80	0.03	2.82	2.80	0.02
	2.92			2.82			2.79		
	2.86			2.76			2.78		
5	2.85	2.85	0.02	2.81	2.82	0.06	2.78	2.76	0.03
	2.86			2.88			2.76		
	2.83			2.76			2.73		
6	2.42	2.42	0.01	2.45	2.43	0.02	2.25	2.34	0.08
	2.41			2.42			2.40		
	2.43			2.42			2.38		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-1 ค่าพีเอชจากการหมักชาชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน (ต่อ)

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	พีเอชของน้ำหมัก								
	ชาดำ			ชาเขียว			ชาอู่หลง		
	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD
7	2.40	2.39	0.02	2.45	2.43	0.02	2.22	2.33	0.09
	2.37			2.42			2.39		
	2.40			2.41			2.37		
8	2.30	2.30	0.02	2.30	2.28	0.03	2.15	2.20	0.05
	2.32			2.29			2.25		
	2.29			2.25			2.20		
9	2.25	2.24	0.01	2.25	2.24	0.01	2.40	2.24	0.14
	2.24			2.23			2.18		
	2.23			2.24			2.13		
10	2.21	2.18	0.03	2.21	2.19	0.02	2.36	2.18	0.16
	2.16			2.19			2.13		
	2.18			2.18			2.06		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-2 ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติกที่ได้จากการหมักชาชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	ร้อยละกรดทั้งหมดในรูปของกรดอะซิติก								
	ชาดำ			ชาเขียว			ชาอู่หลง		
	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD
0	0.10	0.10	0.00	0.09	0.10	0.01	0.08	0.07	0.01
	0.10			0.10			0.06		
	0.10			0.10			0.06		
1	0.15	0.15	0.00	0.13	0.13	0.00	0.13	0.09	0.02
	0.15			0.13			0.10		
	0.15			0.13			0.09		
2	0.18	0.20	0.02	0.14	0.15	0.02	0.13	0.13	0.00
	0.21			0.14			0.13		
	0.21			0.17			0.13		
3	0.40	0.38	0.03	0.35	0.28	0.05	0.30	0.31	0.03
	0.34			0.24			0.34		
	0.38			0.27			0.29		
4	0.51	0.52	0.03	0.46	0.47	0.01	0.39	0.39	0.00
	0.49			0.48			0.39		
	0.55			0.47			0.39		
5	0.78	0.77	0.10	0.70	0.74	0.05	0.67	0.71	0.03
	0.67			0.72			0.73		
	0.86			0.79			0.72		
6	1.10	1.11	0.03	0.94	0.91	0.03	0.77	0.79	0.01
	1.10			0.88			0.79		
	1.14			0.92			0.79		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-2 ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติกที่ได้จากการหมักชาชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน (ต่อ)

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	ร้อยละกรดทั้งหมดในรูปของกรดอะซิติก								
	ชาดำ			ชาเขียว			ชาอู่หลง		
	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD
7	1.41	1.47	0.06	1.21	1.20	0.01	0.83	0.84	0.01
	1.51			1.19			0.83		
	1.51			1.21			0.85		
8	1.74	1.78	0.04	1.46	1.49	0.03	0.96	0.96	0.01
	1.81			1.52			0.97		
	1.81			1.49			0.96		
9	2.06	2.14	0.08	1.68	1.67	0.01	1.34	1.32	0.02
	2.22			1.68			1.29		
	2.15			1.67			1.31		
10	2.40	2.41	0.00	2.11	2.20	0.07	1.95	1.94	0.01
	2.41			2.24			1.94		
	2.41			2.24			1.94		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-3 ปริมาณฟีนอลิกในคอมบูชาจากการหมักชาดำ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	ปริมาณฟีนอลิกในคอมบูชาจากการหมักชาดำ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)																	
	ไม่เจือจาง			เจือจาง 10 เท่า			เจือจาง 20 เท่า			เจือจาง 50 เท่า			เจือจาง 100 เท่า			เจือจาง 200 เท่า		
	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD
0	0.37	0.38	0.01	0.33	0.32	0.01	0.20	0.20	0.00	0.07	0.08	0.01	0.01	0.02	0.00	0.01	0.00	0.00
	0.39			0.32			0.19			0.08			0.01			0.00		
	0.37			0.32			0.20			0.08			0.02			0.00		
1	2.40	2.39	0.02	0.42	0.43	0.01	0.19	0.19	0.01	0.08	0.08	0.00	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.00
	2.39			0.42			0.20			0.08			0.02			0.01		
	2.37			0.43			0.20			0.08			0.03			0.01		
2	2.62	2.62	0.00	0.57	0.57	0.01	0.32	0.33	0.00	0.12	0.12	0.00	0.04	0.05	0.00	0.04	0.03	0.01
	2.62			0.57			0.32			0.11			0.04			0.03		
	2.62			0.56			0.33			0.11			0.05			0.03		
3	2.95	2.95	0.01	0.74	0.74	0.00	0.38	0.38	0.00	0.16	0.16	0.00	0.11	0.12	0.00	0.07	0.07	0.01
	2.95			0.74			0.38			0.16			0.12			0.07		
	2.96			0.74			0.38			0.16			0.11			0.06		

ตารางที่ ค-3 ปริมาณฟีนอลิกในคอมบูชาจากการหมักชาดำ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน (ต่อ)

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	ปริมาณฟีนอลิกในคอมบูชาจากการหมักชาดำ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)																	
	ไม่เจือจาง			เจือจาง 10 เท่า			เจือจาง 20 เท่า			เจือจาง 50 เท่า			เจือจาง 100 เท่า			เจือจาง 200 เท่า		
	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD
4	3.04	3.04	0.00	0.78	0.79	0.00	0.48	0.48	0.00	0.18	0.18	0.00	0.14	0.13	0.01	0.10	0.10	0.01
	3.04			0.78			0.48			0.18			0.13			0.11		
	3.04			0.79			0.48			0.18			0.13			0.10		
5	3.32	3.32	0.01	0.94	0.95	0.00	0.48	0.48	0.01	0.18	0.18	0.00	0.17	0.16	0.01	0.10	0.10	0.01
	3.32			0.94			0.48			0.18			0.16			0.10		
	3.31			0.95			0.49			0.18			0.16			0.09		
6	3.44	3.44	0.00	0.96	0.97	0.01	0.51	0.51	0.00	0.28	0.29	0.01	0.08	0.09	0.00	0.07	0.07	0.00
	3.44			0.97			0.51			0.29			0.09			0.07		
	3.44			0.97			0.51			0.29			0.09			0.07		
7	3.62	3.62	0.00	1.04	1.04	0.01	0.54	0.54	0.01	0.25	0.25	0.00	0.09	0.10	0.00	0.07	0.07	0.00
	3.62			1.04			0.54			0.25			0.10			0.07		
	3.62			1.05			0.53			0.25			0.10			0.07		

ตารางที่ ค-3 ปริมาณฟีนอลิกในคอมบูชาจากการหมักชาดำ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน (ต่อ)

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	ปริมาณฟีนอลิกในคอมบูชาจากการหมักชาดำ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)																	
	ไม่เจือจาง			เจือจาง 10 เท่า			เจือจาง 20 เท่า			เจือจาง 50 เท่า			เจือจาง 100 เท่า			เจือจาง 200 เท่า		
	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD
8	4.18	4.20	0.02	1.05	1.04	0.01	0.51	0.51	0.01	0.32	0.32	0.00	0.14	0.13	0.01	0.11	0.10	0.01
	4.20			1.04			0.52			0.31			0.13			0.10		
	4.22			1.04			0.51			0.32			0.13			0.10		
9	4.47	4.49	0.02	1.14	1.14	0.01	0.58	0.59	0.00	0.21	0.21	0.01	0.13	0.13	0.01	0.08	0.08	0.00
	4.50			1.15			0.59			0.22			0.12			0.07		
	4.49			1.14			0.58			0.21			0.13			0.07		
10	5.74	5.74	0.01	1.01	1.01	0.01	0.54	0.54	0.01	0.19	0.20	0.00	0.11	0.12	0.00	0.09	0.09	0.00
	5.75			1.01			0.54			0.20			0.11			0.08		
	5.74			1.02			0.55			0.20			0.12			0.09		

มหาวิทยาลัยพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ตารางที่ ค-4 ปริมาณฟีนอลิกในคอมบูชาจากการหมักชาเขียว ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	ปริมาณฟีนอลิกในคอมบูชาจากการหมักชาเขียว (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)																	
	ไม่เจือจาง			เจือจาง 10 เท่า			เจือจาง 20 เท่า			เจือจาง 50 เท่า			เจือจาง 100 เท่า			เจือจาง 200 เท่า		
	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD
0	0.18	0.18	0.00	0.25	0.26	0.00	0.12	0.12	0.00	0.06	0.60	0.01	0.04	0.04	0.00	0.05	0.04	0.01
	0.18			0.25			0.12			0.05			0.04			0.04		
	0.18			0.26			0.11			0.06			0.04			0.04		
1	4.14	4.15	0.00	0.28	0.28	0.00	0.14	0.15	0.01	0.08	0.08	0.00	0.06	0.06	0.00	0.05	0.05	0.00
	4.15			0.27			0.15			0.07			0.05			0.05		
	4.14			0.27			0.15			0.07			0.06			0.04		
2	4.22	4.27	0.05	0.29	0.29	0.01	0.15	0.16	0.01	0.08	0.07	0.00	0.05	0.05	0.00	0.03	0.03	0.01
	4.27			0.29			0.16			0.07			0.05			0.03		
	4.32			0.30			0.16			0.07			0.05			0.04		
3	4.55	4.55	0.00	0.33	0.33	0.01	0.17	0.17	0.00	0.11	0.11	0.00	0.07	0.07	0.00	0.02	0.02	0.01
	4.55			0.32			0.16			0.11			0.07			0.03		
	4.55			0.33			0.17			0.11			0.07			0.02		

ตารางที่ ค-4 ปริมาณฟีนอลิกในคอมบูชาจากการหมักชาเขียว ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน (ต่อ)

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	ปริมาณฟีนอลิกในคอมบูชาจากการหมักชาเขียว (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)																	
	ไม่เจือจาง			เจือจาง 10 เท่า			เจือจาง 20 เท่า			เจือจาง 50 เท่า			เจือจาง 100 เท่า			เจือจาง 200 เท่า		
	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD
4	5.17	5.18	0.00	0.43	0.43	0.01	0.25	0.25	0.00	0.11	0.11	0.01	0.08	0.08	0.00	0.04	0.04	0.00
	5.18			0.44			0.24			0.11			0.07			0.04		
	5.18			0.43			0.25			0.12			0.08			0.04		
5	5.22	5.21	0.01	0.50	0.50	0.00	0.24	0.24	0.00	0.08	0.09	0.00	0.07	0.08	0.00	0.05	0.05	0.01
	5.21			0.50			0.24			0.08			0.08			0.04		
	5.20			0.49			0.24			0.09			0.07			0.05		
6	5.34	5.34	0.00	0.54	0.54	0.00	0.31	0.31	0.00	0.11	0.11	0.00	0.07	0.07	0.00	0.03	0.04	0.00
	5.34			0.54			0.31			0.11			0.07			0.04		
	5.34			0.54			0.31			0.11			0.07			0.04		
7	5.45	5.45	0.01	0.64	0.64	0.00	0.32	0.32	0.01	0.14	0.14	0.00	0.07	0.07	0.00	0.05	0.05	0.00
	5.46			0.64			0.32			0.14			0.07			0.05		
	5.45			0.64			0.33			0.14			0.07			0.05		

ตารางที่ ค-4 ปริมาณฟีนอลิกในคอมบูชาจากการหมักชาเขียว ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน (ต่อ)

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	ปริมาณฟีนอลิกในคอมบูชาจากการหมักชาเขียว (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)																	
	ไม่เจือจาง			เจือจาง 10 เท่า			เจือจาง 20 เท่า			เจือจาง 50 เท่า			เจือจาง 100 เท่า			เจือจาง 200 เท่า		
	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD
8	5.67	5.67	0.00	0.65	0.65	0.01	0.34	0.34	0.00	0.15	0.15	0.01	0.08	0.08	0.00	0.05	0.05	0.01
	5.67			0.64			0.34			0.16			0.09			0.05		
	5.66			0.65			0.34			0.15			0.08			0.06		
9	5.72	5.72	0.00	0.66	0.66	0.00	0.38	0.37	0.01	0.15	0.15	0.00	0.11	0.12	0.01	0.06	0.07	0.00
	5.71			0.66			0.37			0.15			0.12			0.07		
	5.72			0.66			0.37			0.15			0.12			0.07		
10	5.73	5.73	0.00	0.71	0.71	0.00	0.34	0.35	0.00	0.16	0.16	0.01	0.10	0.10	0.01	0.08	0.08	0.00
	5.73			0.71			0.35			0.16			0.10			0.08		
	5.73			0.71			0.35			0.15			0.11			0.08		

มหาวิทยาลัยพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ตารางที่ ค-5 ปริมาณฟีนอลิกในคอมบูชาจากการหมักชาอู่หลง ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	ปริมาณฟีนอลิกในคอมบูชาจากการหมักชาอู่หลง (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)																	
	ไม่เจือจาง			เจือจาง 10 เท่า			เจือจาง 20 เท่า			เจือจาง 50 เท่า			เจือจาง 100 เท่า			เจือจาง 200 เท่า		
	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD
0	0.14	0.15	0.01	0.19	0.19	0.00	0.09	0.10	0.01	0.06	0.06	0.00	0.04	0.04	0.01	0.03	0.02	0.00
	0.15			0.18			0.10			0.06			0.03			0.02		
	0.15			0.18			0.10			0.06			0.04			0.02		
1	3.11	3.11	0.00	0.22	0.23	0.00	0.11	0.11	0.01	0.07	0.07	0.00	0.05	0.04	0.01	0.02	0.02	0.00
	3.11			0.23			0.10			0.07			0.04			0.02		
	3.11			0.23			0.11			0.07			0.04			0.02		
2	3.64	3.64	0.00	0.28	0.29	0.01	0.13	0.12	0.01	0.08	0.08	0.00	0.05	0.04	0.01	0.02	0.02	0.01
	3.64			0.29			0.12			0.08			0.04			0.02		
	3.63			0.29			0.12			0.08			0.04			0.03		
3	3.96	3.96	0.01	0.30	0.30	0.01	0.18	0.19	0.00	0.09	0.10	0.01	0.06	0.06	0.01	0.01	0.01	0.00
	3.96			0.30			0.18			0.10			0.05			0.01		
	3.97			0.29			0.19			0.10			0.06			0.01		

ตารางที่ ค-5 ปริมาณฟีนอลิกในคอมบูชาจากการหมักชาอู่หลง ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน (ต่อ)

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	ปริมาณฟีนอลิกในคอมบูชาจากการหมักชาอู่หลง (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)																	
	ไม่เจือจาง			เจือจาง 10 เท่า			เจือจาง 20 เท่า			เจือจาง 50 เท่า			เจือจาง 100 เท่า			เจือจาง 200 เท่า		
	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD
4	4.07	4.07	0.01	0.32	0.31	0.01	0.21	0.21	0.00	0.10	0.10	0.00	0.04	0.04	0.01	0.01	0.02	0.01
	4.07			0.31			0.21			0.10			0.04			0.02		
	4.08			0.31			0.21			0.10			0.03			0.02		
5	4.22	4.22	0.00	0.39	0.40	0.01	0.22	0.22	0.01	0.09	0.09	0.01	0.07	0.07	0.00	0.03	0.03	0.00
	4.22			0.40			0.22			0.10			0.07			0.03		
	4.22			0.40			0.21			0.09			0.07			0.03		
6	4.28	4.28	0.00	0.40	0.40	0.00	0.30	0.30	0.00	0.10	0.10	0.00	0.08	0.08	0.01	0.05	0.05	0.01
	4.28			0.40			0.29			0.10			0.08			0.05		
	4.28			0.41			0.30			0.10			0.09			0.06		
7	4.41	4.41	0.01	0.57	0.58	0.00	0.33	0.33	0.00	0.15	0.15	0.00	0.09	0.08	0.01	0.06	0.06	0.01
	4.41			0.58			0.33			0.14			0.08			0.05		
	4.40			0.58			0.33			0.14			0.08			0.06		

ตารางที่ ค-5 ปริมาณฟีนอลิกในคอมบูชาจากการหมักชาอู่หลง ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน (ต่อ)

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	ปริมาณฟีนอลิกในคอมบูชาจากการหมักชาอู่หลง (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)																	
	ไม่เจือจาง			เจือจาง 10 เท่า			เจือจาง 20 เท่า			เจือจาง 50 เท่า			เจือจาง 100 เท่า			เจือจาง 200 เท่า		
	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD
8	4.65	4.65	0.00	0.60	0.60	0.00	0.27	0.27	0.00	0.14	0.15	0.00	0.07	0.07	0.00	0.05	0.05	0.00
	4.65			0.60			0.27			0.15			0.07			0.05		
	4.65			0.60			0.27			0.15			0.07			0.05		
9	4.69	4.69	0.00	0.54	0.54	0.01	0.29	0.30	0.00	0.11	0.11	0.01	0.06	0.07	0.00	0.04	0.04	0.00
	4.69			0.54			0.29			0.11			0.07			0.04		
	4.69			0.53			0.30			0.12			0.07			0.04		
10	5.49	5.47	0.04	0.57	0.58	0.00	0.31	0.31	0.00	0.11	0.11	0.00	0.08	0.09	0.01	0.05	0.05	0.00
	5.42			0.58			0.31			0.11			0.09			0.04		
	5.50			0.57			0.31			0.11			0.09			0.05		

ตารางที่ ค-6 ร้อยละของการต่อต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชของชาหมักคอมบูชาจากชาดำ ที่หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	ร้อยละของการต่อต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชของชาหมักคอมบูชาจากชาดำ														
	ไม่เจือจาง			50 เท่า			100 เท่า			200 เท่า			300 เท่า		
	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD
0	104.21	104.14	0.53	67.14	66.06	0.99	53.74	52.44	1.88	31.04	31.40	0.33	17.42	13.74	3.79
	103.58			65.84			53.30			31.47			9.85		
	104.63			65.19			50.28			31.68			13.96		
1	107.09	106.88	0.18	70.91	70.17	0.70	55.66	55.66	0.20	35.60	34.86	0.70	22.36	22.96	0.72
	106.77			69.51			55.46			34.80			22.76		
	106.77			70.11			55.86			34.20			23.76		
2	106.81	107.07	0.22	73.32	72.90	0.72	55.81	55.81	0.42	36.22	35.39	0.83	24.97	23.44	2.30
	107.20			72.07			55.40			35.39			24.55		
	107.20			73.32			56.23			34.55			20.80		
3	109.44	109.20	0.21	73.13	73.39	0.26	58.29	59.14	2.42	35.51	35.17	0.39	27.07	27.07	0.00
	109.07			73.39			57.26			34.75			27.07		
	109.07			73.64			61.87			35.26			27.07		

ตารางที่ ค-6 ร้อยละของการต่อต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชของชาหมักคอมบูชาจากชาดำ ที่หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน (ต่อ)

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	ร้อยละของการต่อต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชของชาหมักคอมบูชาจากชาดำ														
	ไม่เจือจาง			50 เท่า			100 เท่า			200 เท่า			300 เท่า		
	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD
4	109.43	109.33	0.44	74.56	74.88	1.01	70.92	67.77	4.26	41.84	41.92	2.55	33.60	32.31	1.48
	109.71			76.01			69.47			39.42			32.63		
	108.86			74.07			62.92			44.51			30.69		
5	108.83	110.30	1.28	75.63	76.14	0.51	68.52	68.77	0.67	45.42	45.50	0.15	34.75	33.48	1.27
	110.91			76.14			69.53			45.67			32.21		
	111.17			76.64			68.27			45.42			33.48		
6	111.26	112.78	1.38	77.24	76.97	0.73	68.92	69.10	0.32	49.49	49.21	0.28	35.52	35.80	0.58
	113.14			77.52			69.47			48.94			36.45		
	113.94			76.13			68.92			49.21			35.34		
7	112.12	111.93	0.19	77.02	77.30	0.28	68.89	69.17	0.74	49.83	50.86	2.28	37.50	37.68	0.16
	111.74			77.30			68.61			53.47			37.78		
	111.93			77.58			70.01			49.27			37.78		

ตารางที่ ค-6 ร้อยละของการต่อต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชของชาหมักคอมบูชาจากชาดำ ที่หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน (ต่อ)

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	ร้อยละของการต่อต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชของชาหมักคอมบูชาจากชาดำ														
	ไม่เจือจาง			50 เท่า			100 เท่า			200 เท่า			300 เท่า		
	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD
8	114.46	114.19	0.31	78.09	78.37	0.74	70.22	70.22	0.84	50.84	51.22	0.43	35.67	36.99	1.27
	113.85			77.81			69.38			51.69			38.20		
	114.26			79.21			71.07			51.12			37.08		
9	114.62	114.97	0.32	78.90	78.31	0.74	70.32	69.37	1.09	56.38	56.02	0.36	42.43	42.19	1.80
	115.04			78.55			68.18			56.02			43.86		
	115.25			77.47			69.61			55.66			40.29		
10	117.44	117.05	0.39	78.62	78.62	0.00	68.13	67.59	0.47	57.64	58.31	0.62	47.96	47.42	0.93
	116.67			78.62			67.32			58.85			46.34		
	117.05			78.62			67.32			58.45			47.96		

ตารางที่ ค-7 ร้อยละของการต่อต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชของชาหมักคอมบูชาจากชาเขียว ที่หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	ร้อยละของการต่อต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชของชาหมักคอมบูชาจากชาเขียว														
	ไม่เจือจาง			50 เท่า			100 เท่า			200 เท่า			300 เท่า		
	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD
0	98.22	100.00	1.78	53.98	53.98	0.00	51.64	49.60	1.97	27.57	29.39	1.61	12.69	12.40	3.07
	101.78			53.98			49.45			29.98			15.32		
	100.00			53.97			47.70			30.63			9.19		
1	97.55	100.09	2.54	58.94	58.73	0.21	52.51	52.30	0.21	31.57	29.29	2.28	18.92	17.47	1.26
	102.63			58.53			52.10			29.29			16.64		
	100.09			58.73			52.30			27.00			16.84		
2	103.35	103.06	0.26	62.06	61.82	0.75	54.11	53.75	1.30	31.35	31.35	0.00	16.54	19.07	3.77
	102.99			62.42			52.31			31.35			23.40		
	102.84			60.98			54.84			31.35			17.26		
3	105.28	106.65	1.37	67.69	68.03	0.81	52.30	53.06	0.91	32.11	32.11	0.50	18.98	19.41	0.73
	106.65			68.96			52.80			32.61			18.98		
	108.02			67.44			54.07			31.60			20.25		

ตารางที่ ค-7 ร้อยละของการต่อต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชของชาหมักคอมบูชาจากชาเขียว ที่หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน (ต่อ)

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	ร้อยละของการต่อต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชของชาหมักคอมบูชาจากชาเขียว														
	ไม่เจือจาง			50 เท่า			100 เท่า			200 เท่า			300 เท่า		
	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD
4	106.891	106.89	0.24	74.74	72.44	3.79	56.63	56.87	0.24	36.14	36.38	1.33	22.56	21.68	2.39
	106.571			68.07			57.11			37.81			23.51		
	107.051			74.50			56.87			35.19			18.98		
5	107.60	107.67	0.11	74.09	74.09	0.96	57.78	58.26	0.42	37.39	38.75	2.35	22.52	22.28	0.86
	107.60			73.13			58.50			41.47			23.00		
	107.79			75.05			58.50			37.39			21.32		
6	107.83	107.40	0.75	73.37	74.13	0.66	59.81	60.06	0.25	49.01	41.98	8.57	22.38	23.81	1.29
	106.53			74.63			60.06			32.43			24.14		
	107.83			74.38			60.31			44.49			24.90		
7	109.15	109.29	0.43	77.21	74.24	2.63	59.98	60.62	0.70	42.74	40.06	2.52	26.62	25.32	1.79
	109.77			72.21			60.53			37.74			26.07		
	108.94			73.32			61.37			39.68			23.29		

ตารางที่ ค-7 ร้อยละของการต่อต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชของซาหมักคอมบูชาจากชาเขียว ที่หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน (ต่อ)

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	ร้อยละของการต่อต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชของซาหมักคอมบูชาจากชาเขียว														
	ไม่เจือจาง			50 เท่า			100 เท่า			200 เท่า			300 เท่า		
	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD
8	110.40	110.67	0.48	73.74	74.27	1.16	62.60	62.25	0.85	41.64	41.29	0.85	22.81	25.20	2.27
	110.40			73.47			61.27			41.91			25.46		
	111.23			75.60			62.86			40.32			27.32		
9	111.24	112.05	0.70	73.01	74.88	1.72	61.38	61.13	1.15	44.89	45.14	0.78	30.26	29.64	2.50
	112.45			76.38			62.13			46.01			31.76		
	112.45			75.26			59.88			44.51			26.89		
10	112.89	113.77	0.80	77.28	76.74	1.30	63.07	63.35	0.47	47.25	48.33	1.24	34.67	31.70	2.58
	114.47			77.68			63.07			48.06			30.21		
	113.95			75.25			63.89			49.68			30.21		

ตารางที่ ค-8 ร้อยละของการต่อต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชของชาหมักคอมบูชาจากชาอู่หลง ที่หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	ร้อยละของการต่อต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชของชาหมักคอมบูชาจากชาอู่หลง														
	ไม่เจือจาง			50 เท่า			100 เท่า			200 เท่า			300 เท่า		
	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD
0	97.56	97.51	0.38	39.87	37.39	3.90	16.54	18.55	1.77	9.33	9.49	0.14	3.55	2.19	1.23
	97.87			39.39			19.91			9.57			1.15		
	97.11			32.90			19.19			9.57			1.37		
1	97.72	97.67	0.23	41.21	42.90	1.49	21.41	21.95	0.51	12.53	11.72	0.81	6.46	4.38	2.23
	97.41			43.43			22.02			10.91			2.02		
	97.87			44.04			22.42			11.72			4.65		
2	101.96	101.11	0.79	55.15	55.92	0.69	34.37	38.99	4.46	24.15	22.83	1.32	13.26	13.92	1.14
	100.39			56.14			39.32			22.83			15.24		
	100.98			56.47			43.28			21.51			13.26		
3	99.10	100.09	0.99	60.98	59.41	2.10	40.72	40.07	1.14	26.89	24.75	1.92	16.03	14.54	1.38
	101.08			57.03			38.75			24.18			13.31		
	100.09			60.24			40.72			23.19			14.30		

ตารางที่ ค-8 ร้อยละของการต่อต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชของชาหมักคอมบูชาจากชาอู่หลง ที่หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน (ต่อ)

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	ร้อยละของการต่อต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชของชาหมักคอมบูชาจากชาอู่หลง														
	ไม่เจือจาง			50 เท่า			100 เท่า			200 เท่า			300 เท่า		
	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD
4	103.82	103.75	0.12	60.17	59.78	0.36	40.14	41.26	1.08	25.36	25.50	0.13	17.97	17.97	0.72
	103.61			59.70			41.34			25.55			17.25		
	103.82			59.46			42.29			25.60			18.68		
5	104.76	104.21	0.63	60.53	60.98	0.56	43.62	42.36	1.21	28.04	27.42	1.09	19.99	19.54	0.41
	103.52			60.80			42.27			28.04			19.18		
	104.35			61.61			41.20			26.16			19.45		
6	103.93	104.23	0.27	61.74	61.00	0.85	42.76	42.29	0.58	29.07	27.58	1.32	18.18	19.48	1.80
	104.46			61.19			41.64			26.56			18.74		
	104.29			60.07			42.48			27.12			21.53		
7	104.99	104.86	0.97	60.21	61.33	1.70	40.60	43.03	2.18	29.39	28.18	1.44	20.42	19.30	1.48
	105.76			60.49			43.68			26.59			19.86		
	103.84			63.29			44.80			28.55			17.62		

ตารางที่ ค-8 ร้อยละของการต่อต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชของชาหมักคอมบูชาจากชาอู่หลง ที่หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน (ต่อ)

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	ร้อยละของการต่อต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชของชาหมักคอมบูชาจากชาอู่หลง														
	ไม่เจือจาง			50 เท่า			100 เท่า			200 เท่า			300 เท่า		
	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD	3 ซ้ำ	ค่าเฉลี่ย	SD
8	106.74	106.22	0.52	60.97	61.72	1.06	44.40	43.56	1.22	31.48	30.27	1.27	19.97	21.19	1.13
	106.22			62.93			44.12			28.96			21.38		
	105.70			61.25			42.16			30.36			22.22		
9	110.19	109.37	0.73	60.19	61.84	2.52	43.13	43.77	1.09	31.38	32.39	0.95	20.77	22.91	2.79
	108.82			64.74			43.13			32.52			21.90		
	109.09			60.57			45.03			33.28			26.07		
10	110.04	110.24	0.20	62.66	62.40	0.82	41.83	44.72	2.62	32.40	33.19	0.79	20.22	24.54	4.14
	110.43			61.48			46.94			33.19			24.93		
	110.24			63.06			45.37			33.97			28.47		