

การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอะซิติก ในระหว่างกระบวนการหมักน้ำส้มสายชูจากเนื้อผลกาแฟ Optimization of Acetic Acid Production During Vinegar Fermentation from Coffee Pulp

นฤมล บุญมี, นักรบ นาคประสม, ชนวัฒน์ นิพัทธ์วิจิตร,
พัฒนา เฟื่องฟู, จริยาพร สังข์ภิรมย์ และกาญจนา นาคประสม*
สาขาวิศวกรรมอาหาร คณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้
ตำบลหนองหาร อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ 50290

กนกวรรณ ตาลดี

สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร
มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ตำบลหนองหาร อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ 50290

Naruemon Boonmee, Nukrob Narkprasom, Chanawat Nitatwichit,
Pattana Fongfu, Jariyaporn Sangpirom and Kanjana Narkprasom*

Department of Food Engineering, Faculty of Engineering and Agro-Industry, Maejo University,
Nong Han, San Sai, Chiang Mai 50290

Kanokwan Tandee

Department of Food Science and Technology, Faculty of Engineering and Agro-Industry,
Maejo University, Nong Han, San Sai, Chiang Mai 5029

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอะซิติกของน้ำส้มสายชูหมักจากเนื้อผลกาแฟ ปัจจัยที่ใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากเนื้อผลกาแฟ คือ ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ (ร้อยละ 6-10 โดยปริมาตร) ปริมาณกลูโคส (ร้อยละ 6-14 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) และปริมาณแบคทีเรีย (ร้อยละ 5-15 โดยปริมาตร) ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมของผลรวมปัจจัยเหล่านี้ถูกกำหนดโดยวิธีพื้นที่ผิวตอบสนองแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน การทดลองพบว่าปัจจัยทั้ง 3 ปัจจัยมีผลต่อปริมาณกรดอะซิติกที่ได้ การวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าข้อมูลที่ได้จากการทดลองมีความเหมาะสมกับสมการพหุนามกำลังสอง เนื่องจากให้ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ 0.8926 และเมื่อนำสมการทางคณิตศาสตร์มาสร้างกราฟสามมิติพื้นที่ผิวตอบสนองและกราฟโครง

*ผู้รับผิดชอบบทความ : aoikanjana@hotmail.com

ร่างเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการทดลองนี้ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่ส่งผลให้ปริมาณกรดอะซิติกมีค่ามากที่สุด ร้อยละ 2.99 ± 0.18 คือ ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ร้อยละ 8 โดยปริมาตร ปริมาณกลูโคสร้อยละ 12 โดยปริมาตร และปริมาณแบคทีเรียร้อยละ 10 โดยปริมาตร ภายใต้สภาวะการผลิตกรดอะซิติกที่ได้สูงที่สุดนี้ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม 229.40 ± 0.882 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ โดยวัดเป็นค่าร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ร้อยละ 38.21 ± 0.745

คำสำคัญ : กรดอะซิติก; น้ำส้มสายชูหมัก; เนื้อผลกาแฟ; แผนการทดลองแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน

Abstract

The objective of this research was to study the optimum conditions of acetic acid production for fermented vinegar from coffee pulp. Variables used to study the optimal conditions of acetic acid production for fermented vinegar from coffee pulp include concentration of alcohol (6-10 %, by volume), concentration of glucose (6-14 %, w/v) and concentration of bacteria (5-15 % by volume). Furthermore, optimal combination of these variables were determined using respond surface methodology (RSM) by Box-Behnken design (BBD). The results showed that all three factors affected the acetic acid. Statistical analysis indicated that the experimental data should be fitted to the quadratic polynomial equation because of it high coefficient of determination with R-square 0.8926. When using mathematical equations to create three-dimensional graphs, response surface areas and outline graphs to find the optimal conditions in this experiment. It was found that the optimum conditions (8 % alcohol, 12 % glucose, and 10 % bacteria), that resulted in the highest acetic acid content were 2.99 ± 0.18 percent. In those conditions, the total phenolic compounds were 229.40 ± 0.882 mg GAE/g DW and had antioxidant activity, measured as a percentage of DPPH free radical inhibition were 38.21 ± 0.745 .

Keywords: acetic acid; fermented vinegar; coffee pulp; Box-Behnken design (BBD)

1. บทนำ

กาแฟเป็นหนึ่งในพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของโลก โดยมี 2 พันธุ์ ที่ได้รับความนิยมมากที่สุดในตลาด คือ พันธุ์อาราบิก้าและโรบัสต้า ในปี พ.ศ. 2558 ประเทศไทยมีครัวเรือนที่ปลูกกาแฟอยู่ประมาณ 24,000 ครัวเรือน และมีเนื้อที่ให้ผลผลิตกาแฟอยู่ที่ประมาณ 252,377 ไร่ สำหรับกาแฟพันธุ์อาราบิก้าเป็นหนึ่งในพืชเศรษฐกิจสำคัญที่ช่วยสร้างโอกาสทางอาชีพและรายได้

ให้กับเกษตรกรในภาคเหนือของประเทศไทย อีกทั้งเป็นพันธุ์กาแฟที่นิยมมากที่สุดของคนทั่วโลก เนื่องจากมีลักษณะเด่น คือ มีกลิ่นหอม มีรสชาติกลมกล่อม ไม่ขม และมีคาเฟอีนน้อยกว่าพันธุ์โรบัสต้า โดยส่วนใหญ่แหล่งปลูกพันธุ์อาราบิก้าอยู่ในภาคเหนือ เช่น จังหวัดเชียงใหม่ จังหวัดเชียงราย นอกจากนี้ยังมีการส่งเสริมให้ปลูกในพื้นที่ป่าชุมชนที่ทางภาครัฐสนับสนุนให้เกษตรกรปลูก เช่น จังหวัดตาก จังหวัดแพร่ ตั้งแต่ปี

พ.ศ. 2553 เป็นต้นมา [1]

กระบวนการแปรรูปเมล็ดกาแฟต้องนำผลกาแฟสุกที่มีสีแดง (cherry) ไปผ่านเครื่องสีกาแฟหรือเครื่องสีกาแฟเชอรี่ เพื่อแยกส่วนของเนื้อผลกาแฟที่อยู่ชั้นนอกสุดออก (coffee pulp) หลังจากนั้นกำจัดเปลือกหุ้มเมล็ดออกด้วยการสีเปลือกเพื่อให้ได้เมล็ดกาแฟไปแปรรูปในกระบวนการคั่วเมล็ดกาแฟต่อไป กระบวนการแปรรูปข้างต้นส่วนใหญ่พบว่ามีความสูญเสียทั้งในกระบวนการแปรรูปเมล็ดกาแฟ ได้แก่ เนื้อผลกาแฟ (coffee pulp) ประมาณ 55 % ของผลกาแฟ และเปลือกหุ้มเมล็ดกาแฟ (hull and husk) 29 % ของผลกาแฟ [2] เมื่อความต้องการเมล็ดกาแฟเพิ่มขึ้น ส่วนที่เป็นวัสดุเหลือทิ้งจากการผลิต เช่น เนื้อผลกาแฟ จึงมีปริมาณเพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งส่วนใหญ่วัสดุเหลือทิ้งเหล่านี้มักจะถูกปล่อยให้หมักเองตามธรรมชาติ ทำให้มีกลิ่นไม่พึงประสงค์และเกิดเป็นมลภาวะทางอากาศ อย่างไรก็ตาม มีรายงานเกี่ยวกับสารประกอบต่าง ๆ ที่พบในเนื้อผลกาแฟ ได้แก่ แทนนิน (1.80-5.56 %) กรดคลอโรจีนิก (2.6 %) สารกลุ่มเพคติก (6.5 %) น้ำตาลรีดิวิส/ไมรีดิวิส (12.4/2.0 %) คาเฟอีน (1.3 %) และกรดคาเฟอิกทั้งหมด (1.6 %) และยังมีรายงานเพิ่มเติมว่าในเนื้อผลกาแฟมีสารประกอบในกลุ่มฟีนอลและกลุ่มฟลาโวนอยด์สูง โดยเฉพาะแอนโทไซยานินซึ่งพบมากในเนื้อผลกาแฟสุกหรือเนื้อผลกาแฟเชอรี่ที่เป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ [3] คณะผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะนำวัสดุเหลือทิ้งเหล่านี้มาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์น้ำส้มสายชูหมักเพื่อสุขภาพ ซึ่งนอกจากจะเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับวัสดุเหลือทิ้งเหล่านี้แล้ว ยังเป็นการลดมลภาวะทางอากาศอีกด้วย

น้ำส้มสายชู (vinegar) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการหมักและเป็นสารละลายที่มีกรดน้ำส้ม (acetic acid) เป็นองค์ประกอบหลัก [4] กระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอน

แรกเป็นการหมักน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ ซึ่งเป็นกระบวนการหมักแบบไม่ใช้อากาศ โดยการใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* และขั้นตอนที่ 2 เป็นการออกซิไดซ์แอลกอฮอล์ให้เป็นกรดอะซิติก [5] โดยอาศัยแบคทีเรียกลุ่ม acetic acid bacteria ในสภาวะที่มีอากาศ หลังจากนั้นจึงนำไปกรองหรือนำไปกลั่นเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์น้ำส้มสายชู ปัจจุบันน้ำส้มสายชูหมักได้รับความนิยมในการบริโภค เนื่องจากมีประโยชน์ต่อร่างกาย ทำให้ระบบย่อยอาหารดีขึ้น ทำลายจุลินทรีย์ก่อโรคในร่างกาย เร่งการเผาผลาญไขมัน บรรเทาอาการไอข้ออักเสบ แก้ปัญหาการนอนไม่หลับ รักษาโรคความดันโลหิตสูง และควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด [6] โดยทั่วไปน้ำส้มสายชูหมักจะผลิตจากผลไม้ เช่น องุ่น แอปเปิล สับปะรด ฯลฯ นอกจากนี้ยังมีการนำวัสดุเหลือทิ้งจากทางการเกษตรและทางอุตสาหกรรมอาหารมาใช้ในการผลิต คณะผู้วิจัยจึงมีแนวความคิดที่จะนำวัสดุเหลือทิ้งจากกระบวนการแปรรูปกาแฟ ในส่วนของเนื้อผลกาแฟมาใช้ในการผลิตน้ำส้มสายชูที่มีประโยชน์เพื่อสุขภาพ

ปัจจุบันมีการใช้เทคนิคทางคณิตศาสตร์ร่วมกับสถิติในการวางแผนและวิเคราะห์ผลการทดลอง โดยช่วยในการหาสภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการผลิตต่าง ๆ ในภาคอุตสาหกรรม ซึ่งวิธีพื้นที่ผิวตอบสนอง (respond surface methodology, RSM) เป็นวิธีที่นิยมสำหรับการประยุกต์ใช้ในการออกแบบการทดลอง และศึกษาความสัมพันธ์ของตัวแปรอิสระที่มีต่อตัวแปรตอบสนอง อีกทั้งยังสามารถพัฒนาสมการแบบจำลองทางคณิตศาสตร์และหาระดับของตัวแปรอิสระที่ให้ผลตอบสนองที่ดีที่สุด นอกจากนี้ยังให้ความแม่นยำของสมการแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ ซึ่งเทคนิคนี้ยังสามารถลดจำนวนการทดลองและหาสภาวะที่เหมาะสมจากหลาย ๆ ปัจจัยในกระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักเพื่อให้ได้ปริมาณกรดอะซิติกสูงสุด [7]

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอะซิติกของน้ำส้มสายชูหมักจากเนื้อผลกาแฟ เพื่อให้ได้ปริมาณกรดอะซิติกสูงที่สุด โดยปัจจัยที่ศึกษามีทั้งหมด 3 ปัจจัย ได้แก่ ร้อยละของแอลกอฮอล์ ปริมาณกลูโคส และร้อยละของแบคทีเรีย *Acetobacter pasteurianus* TISTR 102 ในการผลิตน้ำส้มสายชูจากเนื้อผลกาแฟ นอกจากนั้นยังหาปริมาณฟีนอลิกรวม (total phenolic compound) ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu reagent ตรวจสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity (DPPH assay) และตรวจวิเคราะห์สมบัติทางเคมีและกายภาพในน้ำส้มสายชูหมักจากเนื้อผลกาแฟด้วย

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การเตรียมวัตถุดิบ

การวิจัยนี้ใช้เนื้อผลกาแฟพันธุ์อาราบิก้าที่ได้รับมาจาก บริษัท ฮิลล์คอฟฟี่ จำกัด จังหวัดเชียงใหม่ โดยนำตัวอย่างเนื้อผลกาแฟมาทำแห้งโดยใช้เครื่องอบแห้งแบบลมร้อน (ยี่ห้อ Memmert รุ่น UE 400, ประเทศเยอรมัน) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนกระทั่งมีความชื้นอยู่ที่ร้อยละ 5-6 และค่าวอเตอร์แอกติวิตี (a_w) ต่ำกว่า 0.5

2.2 กระบวนการหมักเพื่อให้ได้แอลกอฮอล์

ขั้นตอนนี้ใช้ยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* ยี่ห้อ Lavin-EC118 โดยนำเนื้อผลกาแฟพันธุ์อาราบิก้า (*Coffea arabica* L.) มาใช้ในการผลิตไวน์ ซึ่งใช้วิธีการที่ดัดแปลงจาก เจนจิรา และคณะ [7] โดยใช้อัตราส่วนเนื้อผลกาแฟพันธุ์อาราบิก้าแห้ง 30 กรัม ต่อน้ำ 2.5 ลิตร เมื่อน้ำเดือด จับเวลา 20 นาที แล้วจึงปิดแก๊ส จากนั้นกรองเอาเนื้อผลกาแฟออกโดยใช้ผ้าขาวบาง เติมน้ำตาลทรายขาวเพื่อปรับค่า

ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเป็น 24 องศาบริกซ์ ทั้งน้ำตาลเนื้อผลกาแฟไว้นั้นกว่าอุณหภูมิจะได้ 50 องศาเซลเซียส แล้วเทลงในถังหมัก แล้วจึงเติมหัวเชื้อยีสต์ ปริมาณ 25 กรัม ต่อ 100 ลิตร พร้อมทั้งใส่อาหารเลี้ยงยีสต์ diammonium phosphate (DAP) ปริมาณ 0.5 กรัม/ลิตร ปิดถังด้วยแอร์ล็อก จากนั้นตรวจวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณกรดทั้งหมด ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด และปริมาณร้อยละของแอลกอฮอล์ ขั้นตอนนี้จะได้ไวน์จากเนื้อผลกาแฟ

2.3 กระบวนการหมักเพื่อให้ได้กรดอะซิติกจาก

กระบวนการหมักเพื่อให้ได้กรดอะซิติกจากเนื้อผลกาแฟ ทำโดยการใช้ไวน์จากเนื้อผลกาแฟที่ได้จากการหมักในข้อ 2.2 มาแบ่งใส่ถังหมักที่มีขนาด 5 ลิตร และเจือจางไวน์กับน้ำให้มียีสต์และแอลกอฮอล์ต่างกัน (6, 8 และ 10 % โดยปริมาตร) จากนั้นใส่กลูโคสซึ่งเป็นอาหารของแบคทีเรียในปริมาณต่างกัน (6, 10 และ 14 % โดยน้ำหนัก/ปริมาตร) และเติมแบคทีเรีย *Acetobacter pasteurianus* TISTR 102 ในปริมาณต่างกัน (5, 10 และ 15 % โดยปริมาตร) ซึ่งในการเตรียมแบคทีเรียในทุกการทดลองจะเพาะเชื้อจนถึงระยะกึ่งกลางของระยะเพิ่มจำนวนของแบคทีเรีย (mid-log phase) ที่เพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วในอัตราคงที่ด้วยวิธีการเขย่าให้อากาศ เป็นเวลา 2 วัน ทำให้น้ำส้มสายชูหมักจากเนื้อผลกาแฟทั้งหมด 15 การทดลอง โดยวิธีพื้นที่ผิวตอบสนองแบบ Box-Behken (BBD) โดยกระบวนการหมักเพื่อให้ได้กรดอะซิติกที่ได้จากเนื้อผลกาแฟซึ่งศึกษาภายใต้สภาวะที่มีอากาศและบันทึกค่าปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติก

2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณกรดอะซิติกในน้ำส้มสายชูหมักจากเนื้อผลกาแฟ

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากเนื้อผลกาแฟเพื่อให้ได้กรดอะซิติกสูงสุดนั้น ศึกษาด้วยวิธีพื้นที่ผิวตอบสนอง (response

surface methodology, RSM) วางแผนการทดลองด้วยวิธี Box-Behken design (BBD) โดยปัจจัยที่ศึกษาทั้งหมด 3 ปัจจัย ได้แก่ ร้อยละของแอลกอฮอล์ (X_1) ร้อยละของกลูโคสที่ใช้ (X_2) และร้อยละของ *Acetobacter pasteurianus* TISTR 102 (X_3) การทดลองจะตั้งค่ารหัสของระดับของปัจจัยที่ใช้ในการทดลองเป็น 3 ระดับ คือ ระดับต่ำ (-1) ระดับกลาง (0) และระดับสูง (1) ดังแสดงในตารางที่ 1 และในการทดลองการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากเนื้อผลกาแฟนั้น ใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติกำหนดลำดับการทดลองและออกแบบการทดลองแบบ BBD ที่มี 3 ปัจจัย แต่ละปัจจัยมี 3 ระดับ และมีการทำซ้ำที่จุดกึ่งกลาง 3 ครั้ง ดังนั้นจึงมีจำนวนการทดลองทั้งหมด 15 การทดลอง

ตารางที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าจริงและรหัสของตัวแปร

ปัจจัยที่ต้องศึกษา	ตัวแปร	ระดับ		
		-1	0	1
ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ (%)	X_1	6	8	10
ปริมาณกลูโคส (%)	X_2	6	10	14
ปริมาณแบคทีเรีย (%)	X_3	5	10	15

2.5 การวิเคราะห์ตัวอย่าง

2.5.1 การหาปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้

วัดโดยใช้ hand refractometer (ยี่ห้อ Master ประเทศญี่ปุ่น) โดยหยดตัวอย่างไวน์ปริมาณ 2 หยด ลงบนแผ่นปริซึม ปิดด้วยแผ่นกันแสงให้ไวน์อยู่ทั่วแผ่นปริซึม อ่านสเกลที่ได้ผ่านทาง eye-piece ในที่มีแสง บันทึกค่าที่อ่านได้ ทำเช่นเดียวกันนี้กับไวน์จากเนื้อผลกาแฟจำนวน 3 ซ้ำ (โดยต้องทำความสะอาดแผ่น

แผ่นปริซึมให้สะอาดทุกครั้ง ก่อนวัดในครั้งถัดไป)

2.5.2 การวัดค่า pH

นำไวน์จากเนื้อผลกาแฟปริมาณ 20 มิลลิลิตร ไปวัดค่า pH ด้วยเครื่อง pH meter (ยี่ห้อ Mettler Toledo FiveEasy™ Plus รุ่น FEP20 ประเทศสวิตเซอร์แลนด์) แล้วอ่านค่าและบันทึกผล โดยทำเช่นเดียวกันนี้จำนวน 3 ซ้ำ

2.5.3 การวัดปริมาณแอลกอฮอล์

ตรวจวัดโดยใช้เครื่อง ebulliometer (Per Vinum J. Salleron Dujardin ประเทศฝรั่งเศส) โดยการวัดแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ วัดจุดเดือดของน้ำบริสุทธิ์ก่อน แล้วจึงหาจุดเดือดของไวน์ โดยการเติมน้ำกลั่นจนถึงขีด EAU และเทใส่ boiling chamber แล้วใส่เทอร์โมมิเตอร์ให้ปลายอยู่เหนือไวน์ใน boiling chamber ต้มน้ำจนเดือดด้วยตะเกียงแอลกอฮอล์ เมื่อถึงจุดเดือดที่อุณหภูมิคงที่ อ่านค่าและบันทึกอุณหภูมิจุดเดือดของน้ำกลั่นจากเทอร์โมมิเตอร์ แล้วนำค่าจุดเดือดของน้ำบริสุทธิ์ที่ได้ไปตั้งค่าในแผ่นอ่านเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ (Dosage de l'Alcool dans les vins) โดยตั้งจุดเดือดของน้ำบริสุทธิ์ที่อ่านได้ (ดูสเกลด้านใน) ให้ตรงกับเลข 0.0 จากนั้นหาจุดเดือดของไวน์จากเนื้อผลกาแฟ โดยการเติมน้ำลงไปในหลอดแก้วของเครื่อง ebulliometer จนถึงขีด VIN แล้วเทใส่ boiling chamber ต่อมาเติมน้ำลงในส่วนควบแน่น แล้วใส่เทอร์โมมิเตอร์ให้ปลายอยู่เหนือไวน์ใน boiling chamber ต้มน้ำจนตัวอย่างจนเดือดด้วยตะเกียงแอลกอฮอล์ เมื่อถึงจุดเดือดที่อุณหภูมิคงที่ประมาณ 20 วินาที อ่านจุดเดือดของไวน์และบันทึกผล อ่านและบันทึกผลเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ของไวน์ (ดูที่สเกลนอก) ที่อยู่ตรงกันกับจุดเดือดของสารตัวอย่าง (ดูที่สเกลใน) จากแผ่นอ่านเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ แล้วบันทึกผล โดยทุกครั้งที่เปลี่ยนตัวอย่างไวน์ต้องล้างทำความสะอาด boiling chamber ทุกครั้ง และเปลี่ยนน้ำ

ในส่วนควบแน่นอยู่เสมอ

2.5.4 การหาปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดทาร์ทาริก

โดยเติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร และไวน์ 0.1 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ หยดฟีนอล์ฟทาลีน (phenolphthalein) 2 หยด เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปไตเตรทกับโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้น 0.1 N แล้วบันทึกปริมาตรของ NaOH ที่ใช้ ทำเช่นเดียวกันนี้จำนวน 3 ซ้ำ จากนั้นนำค่าที่บันทึกได้ไปคำนวณหาปริมาณกรดทาร์ทาริกจากสมการที่ 1 [8]

$$\text{เปอร์เซ็นต์กรดทาร์ทาริก} = \frac{[\text{ความเข้มข้นของ NaOH (0.1 N)} \times \text{ปริมาตร NaOH ที่ใช้ (มิลลิลิตร)} \times 0.075 \times 100] \div \text{ปริมาตรไวน์จากเนื้อผลกาแฟ (มิลลิลิตร)}}{1} \quad (1)$$

2.5.5 การหาปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติก

โดยเติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร และน้ำส้มสายชูหมักจากเนื้อผลกาแฟแห้ง 0.1 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ หยดฟีนอล์ฟทาลีน (phenolphthalein) 2 หยด เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปไตเตรทกับโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้น 0.1 N แล้วบันทึกปริมาตรของ NaOH ที่ใช้ ทำเช่นเดียวกันนี้จำนวน 3 ซ้ำ จากนั้นนำค่าที่บันทึกได้ไปคำนวณหาปริมาณกรดอะซิติกจากสมการที่ 2 [8]

$$\text{เปอร์เซ็นต์กรดอะซิติก} = \frac{[\text{ความเข้มข้นของ NaOH (0.1 N)} \times \text{ปริมาตร NaOH ที่ใช้ (มิลลิลิตร)} \times 0.064 \times 100] \div \text{ปริมาตรไวน์จากเนื้อผลกาแฟ (มิลลิลิตร)}}{2} \quad (2)$$

2.5.6 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม (total phenolic compound)

การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu reagent ดัดแปลงจากวิธีของ Kaisoon [10] โดยมีวิธีการทดสอบดังนี้ เริ่มจากนำน้ำส้มสายชูหมักจากเนื้อผลกาแฟปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง เติมน้ำกลั่นละลายโซเดียมคาร์บอเนต

(Na_2CO_3) ความเข้มข้นร้อยละ 2 (โดยมวลต่อปริมาตร) จำนวน 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วเติมน้ำกลั่นละลาย Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ปิดปากหลอดด้วยกระดาษฟอยด์หรือถุงฟอยด์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที (ในที่มืด) แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (S1200 Visible Diode Array Spectrophotometer, WPA Spectrawave, ประเทศอังกฤษ) ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมในสารสกัดโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก (gallic acid) และรายงานผลการทดลองเป็นมิลลิกรัมต่อกรัมกรดแกลลิก (mg/g Galic acid equivalent, GAE)

2.5.7 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (DPPH assay)

วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ตามวิธีการที่ดัดแปลงจากวิธีการของ Shimada และคณะ [11] โดยปิเตรดสารละลาย DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) เข้มข้น 0.1 mM ในเมทานอล 2.9 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง เติมห่วงอย่างส่วนใสลงไป 0.1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ในเมทานอล 2.9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ด้วยเครื่องผสม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที (ในที่มืด) พร้อมกันนี้ทำตัวอย่างควบคุม (control) หรือสารละลาย DPPH ที่ไม่มีตัวอย่างสารสกัด วิเคราะห์ตามวิธีการเดียวกัน จากนั้นนำตัวอย่างน้ำส้มสายชูหมักจากเนื้อผลกาแฟและตัวอย่างควบคุมมาทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร คำนวณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเป็นร้อยละของการยับยั้ง (% inhibition) จากสมการที่ 3

$$\% \text{Inhibition} = \frac{(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}})}{A_{\text{control}}} \times 100 \quad (3)$$

2.5.8 การวัดค่าสี L^* , a^* , b^* ด้วยเครื่อง colorimeter

ใช้เครื่องวัดสี (ยี่ห้อ Hunter Lab รุ่น mini scan XE Plus ประเทศสหรัฐอเมริกา) วัดคุณลักษณะด้านสีของน้ำส้มสายชูหมักจากเนื้อผลกาแฟ โดยค่า L^* แสดงถึงค่าความสว่าง 0 ถึง 100 ค่า ($+a^*$) แสดงถึงค่าสีแดง ค่า ($-a^*$) แสดงถึงค่าสีเขียว ค่า ($+b^*$) แสดงถึงค่าสีเหลือง และค่า ($-b^*$) แสดงถึงค่าสีน้ำเงิน

2.6 การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสม

เมื่อทดลองการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากเนื้อผลกาแฟทั้ง 15 การทดลอง แล้วนำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ความถูกต้องของแบบจำลอง การวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R-square) และการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) เพื่อนำมาสร้างสมการทำนายปริมาณกรดอะซิติกที่ได้ โดยนำค่าของปัจจัยที่ได้จากวิเคราะห์สัมประสิทธิ์ของสมการถดถอยของปริมาณกรดอะซิติกมาเขียนในรูปของสมการ ดังสมการที่ 4

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 \quad (4)$$

เมื่อ Y คือ ผลการตอบสนอง ได้แก่ ปริมาณกรดอะซิติกที่ได้, X_1, X_2, X_3 คือ ตัวแปรอิสระ หรือปัจจัยที่ศึกษา, β_0 คือ ค่าคงที่สมการ, $\beta_1, \beta_2, \beta_3$ คือ สัมประสิทธิ์สมการเส้นตรง, $\beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{23}$ คือ สัมประสิทธิ์สมการปฏิพัทธ์ และ $\beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}$ คือ สัมประสิทธิ์สมการกำลังสอง

เมื่อได้สมการทำนายปริมาณกรดอะซิติกที่ได้จากการกระบวนการหมักเนื้อผลกาแฟแล้ว จึงนำมาสร้างกราฟพื้นที่ผิวตอบสนองของปริมาณกรดอะซิติกที่ได้เทียบกับปัจจัยที่ใช้ในการทดลองทั้ง 3 ปัจจัย โดยใช้

โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากเนื้อผลกาแฟ เพื่อให้ได้ปริมาณกรดอะซิติกที่มีค่าสูงสุดและอยู่ภายใต้ระดับของค่าปัจจัยในการทดลอง จากนั้นหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟีนอลิกรวม และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (ร้อยละของการยับยั้ง) ของน้ำส้มสายชูหมักจากเนื้อผลกาแฟ

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

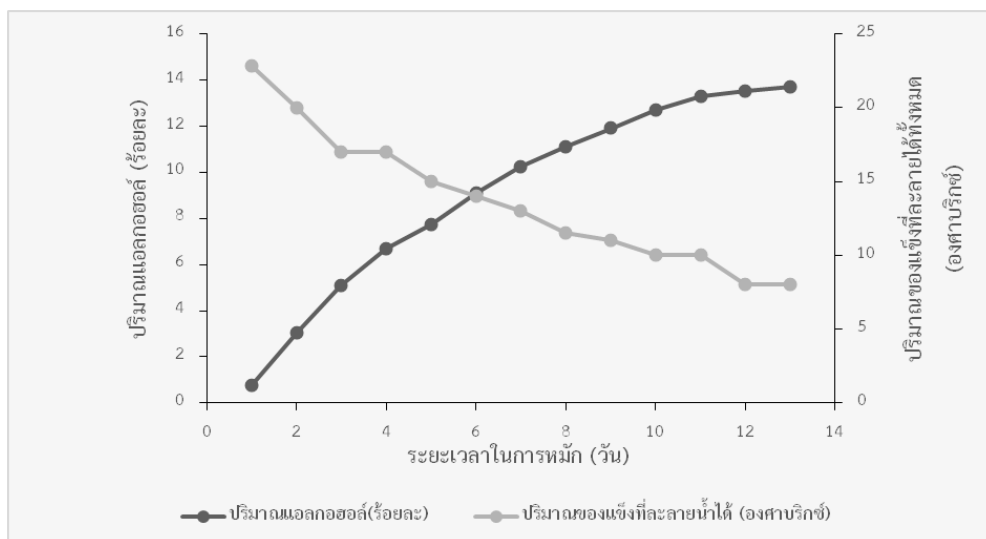
3.1 ผลของกระบวนการหมักเพื่อให้ได้แอลกอฮอล์ของไวน์จากเนื้อผลกาแฟ

กระบวนการผลิตแอลกอฮอล์ของน้ำหมักจากเนื้อผลกาแฟเป็นวัตถุดิบตั้งต้นโดยใช้ยีสต์แห้ง [*Saccharomyces cerevisiae* (Lalvin EC-1118)] โดยน้ำหมักจากเนื้อผลกาแฟจะมีการปรับค่าของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด 24 องศาบริกซ์ จากผลการทดลองพบว่าในระหว่างกระบวนการหมักมีการเปลี่ยนแปลงค่าทางเคมีอย่างมีนัยสำคัญ โดยเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น ปริมาณร้อยละของแอลกอฮอล์จะมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนระยะเวลาในการหมักผ่านไป 2 สัปดาห์ ปริมาณร้อยละของแอลกอฮอล์จะเริ่มคงที่ที่ร้อยละ 13 โดยปริมาตร แต่ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดมีการลดลงอย่างต่อเนื่อง จากเดิม 24 องศาบริกซ์ และเริ่มคงที่ลดจากเดิมเหลือเพียง 8 องศา บริกซ์ ที่ระยะเวลาในการหมักผ่านไป 2 สัปดาห์ เนื่องจากยีสต์มีการเปลี่ยนน้ำตาลในน้ำหมักจากเนื้อผลกาแฟไปเป็นแอลกอฮอล์ และมีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 4.25-4.43 ซึ่งความเป็นกรดทำให้ยีสต์หยุดการเจริญเติบโตได้ โดยปกติยีสต์จะเจริญเติบโตได้ดีที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.5

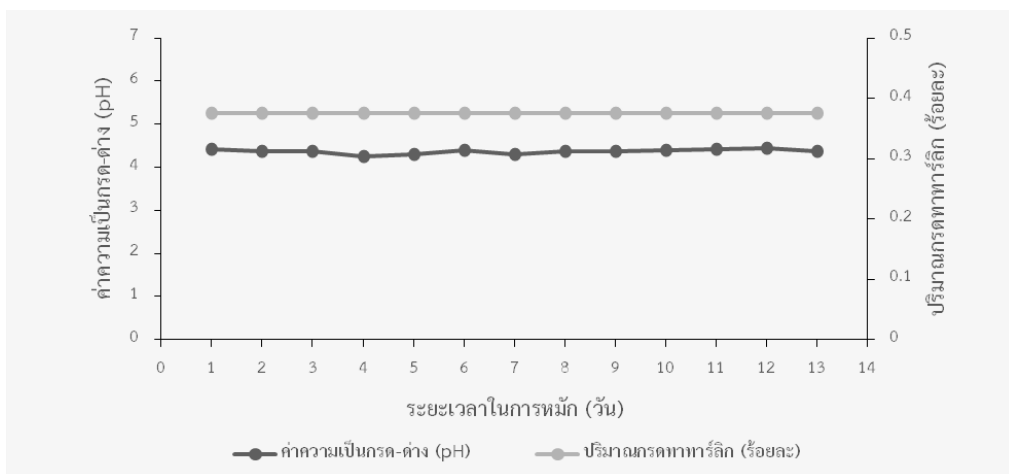
รูปที่ 1 แสดงผลของการกระบวนการหมักด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* (Lalvin EC-1118) โดยใช้ น้ำหมักจากเนื้อผลกาแฟเป็นวัตถุดิบเพื่อ

ผลิตแอลกอฮอล์ ซึ่งแสดงปริมาณแอลกอฮอล์ (ร้อยละ) และปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (องศาบริกซ์) ในระหว่างกระบวนการหมัก และรูปที่ 2 แสดงผลของกระบวนการหมักด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevi-*

siae (Lalvin EC-1118) โดยใช้น้ำหมักจากเนื้อผลกาแฟเป็นวัตถุดิบเพื่อผลิตแอลกอฮอล์ ได้แสดงปริมาณกรด (ร้อยละ) และค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในระหว่างกระบวนการหมัก ซึ่งไว้นอกจากเนื้อผลกาแฟที่ได้



รูปที่ 1 กระบวนการหมักด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* (Lalvin EC-1118) โดยใช้น้ำหมักจากเนื้อผลกาแฟแห้งเป็นวัตถุดิบเพื่อผลิตแอลกอฮอล์ ซึ่งได้แสดงปริมาณแอลกอฮอล์ (ร้อยละ) และปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (องศาบริกซ์) ในระหว่างกระบวนการหมัก



รูปที่ 2 กระบวนการหมักด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* (Lalvin EC-1118) โดยใช้น้ำหมักจากเนื้อผลกาแฟแห้งเป็นวัตถุดิบเพื่อผลิตแอลกอฮอล์ ซึ่งได้แสดงปริมาณกรด (ร้อยละ) และค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในระหว่างกระบวนการหมัก

มีความสอดคล้องกับมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนไวน์ผลไม้ [11] ที่ระบุไว้ว่าไวน์ผลไม้ที่ทำการนำวัตถุดิบจำพวกผลไม้มาผ่านกรรมวิธีการผลิตไวน์ผลไม้ควรมีปริมาณแอลกอฮอล์ไม่เกิน 15 ดีกรี/ร้อยละโดยปริมาตร

3.2 ผลของการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากเนื้อผลกาแฟ

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากเนื้อผลกาแฟ มีปัจจัยที่ต้องการศึกษา 3 ปัจจัย ได้แก่ ร้อยละของแอลกอฮอล์ ปริมาณกลูโคส และร้อยละของแบคทีเรีย *A. pasteurianus* TISTR 102 จากผลการทดลองพบว่าปริมาณร้อยละของ

กรดอะซิติกที่ได้อยู่ในช่วง 0.32-2.88 โดยสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากเนื้อผลกาแฟ ได้แก่ แอลกอฮอล์ร้อยละ 8 (โดยปริมาตร) ปริมาณกลูโคสร้อยละ 10 (โดยปริมาตร) และแบคทีเรียร้อยละ 10 (โดยปริมาตร) ส่งผลให้น้ำส้มสายชูหมักมีปริมาณกรดอะซิติกสูงที่สุด คือ ร้อยละ 2.88 ดังแสดงในตารางที่ 2

3.3 การสร้างสมการทำนายปริมาณกรดอะซิติกที่ได้จากกระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากเนื้อผลกาแฟ

การวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R-square, R^2) มีค่า 0.8926 หมายความว่าตัวแปร

ตารางที่ 2 ผลของการออกแบบพื้นที่ผิวตอบสนองของปริมาณกรดอะซิติก โดยวิธีการออกแบบการทดลองแบบ Box-Behken design (BBD)

ลำดับการทดลอง	ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ (%) (X_1)	ปริมาณกลูโคส(%) (X_2)	ปริมาณแบคทีเรีย(%) (X_3)	ปริมาณกรดอะซิติก (%) (Y)
1	6 (-1)	6 (-1)	10 (0)	0.32
2	10 (1)	6 (-1)	10 (0)	0.32
3	6 (-1)	14 (1)	10 (0)	0.32
4	10 (1)	14 (1)	10 (0)	2.56
5	6 (-1)	10 (0)	5 (-1)	2.56
6	10 (1)	10 (0)	5 (-1)	2.56
7	6 (-1)	10 (0)	15 (1)	1.28
8	10 (1)	10 (0)	15 (1)	2.56
9	8 (0)	6 (-1)	5 (-1)	0.32
10	8 (0)	14 (1)	5 (-1)	1.6
11	8 (0)	6 (-1)	15 (1)	1.6
12	8 (0)	14 (1)	15 (1)	2.56
13	8 (0)	10 (0)	10 (0)	2.88
14	8 (0)	10 (0)	10 (0)	2.88
15	8 (0)	10 (0)	10 (0)	2.88

อิสระ (ร้อยละของแอลกอฮอล์ (X_1) ร้อยละของกลูโคส (X_2) และร้อยละของแบคทีเรีย *A. pasteurianus* TISTR 102 (X_3) ปริมาณกรดอะซิติกที่ได้ (Y) ร้อยละ 89.26 ซึ่งค่า R^2 เป็นค่าที่ใช้เพื่อพิจารณาความเหมาะสมของแบบจำลอง โดยแบบจำลองที่ดีควรมีค่า R^2 เข้าใกล้ 1.0 การทดสอบความเหมาะสมของสมการถดถอยพิจารณาจาก lack of fit ซึ่งจากข้อมูลการทดลองนี้มีค่า 0.55 พบว่าไม่นัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) แสดงว่าแบบจำลองที่ได้มีความเหมาะสมกับข้อมูลการทดลองอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของปริมาณกรดอะซิติกที่ได้จากการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากเนื้อผลกาแฟที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 ในตารางที่ 3 พบว่า p-value ในเทอมกำลังสองของ X_2^2 มีค่า 0.0062 ซึ่งมีค่าน้อยกว่าค่านัยสำคัญทางสถิติที่กำหนด แสดงว่ามีแนวโน้มเกิดขึ้นที่พื้นที่ผิวตอบสนอง [12]

การวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อสร้างสมการทางคณิตศาสตร์ พบว่าสมการพหุนามกำลังสองถูกเลือกมาใช้ในการทำนายหาสภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากเนื้อผลกาแฟ เพื่อให้ได้ปริมาณกรดอะซิติกสูงที่สุด ดังแสดงในสมการที่ 5

$$Y = 2.88 + 0.44X_1 + 0.56X_2 + 0.12X_3 + 0.56X_1X_2 + 0.32X_1X_3 - 0.080X_2X_3 - 0.64X_1^2 - 1.36X_2^2 + 0.000X_3^2 \quad (5)$$

3.4 การสร้างพื้นที่ผิวตอบสนองของปริมาณกรดอะซิติกจากกระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากเนื้อผลกาแฟ

กราฟสามมิติพื้นที่ผิวตอบสนองของปริมาณกรดอะซิติกที่ได้จากกระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากเนื้อผลกาแฟ ในรูปที่ 3 ระบุค่าความเข้มข้นของแอลกอฮอล์และร้อยละของกลูโคส โดยกำหนดให้ปริมาณแบคทีเรียคงที่ พบว่าเมื่อความ

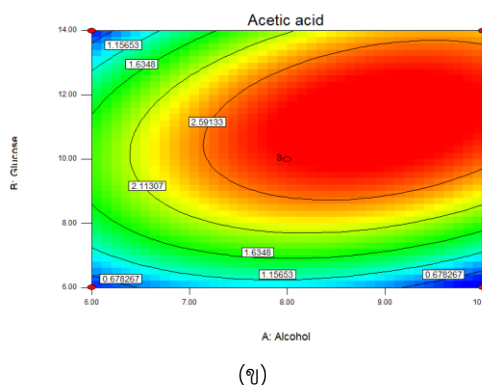
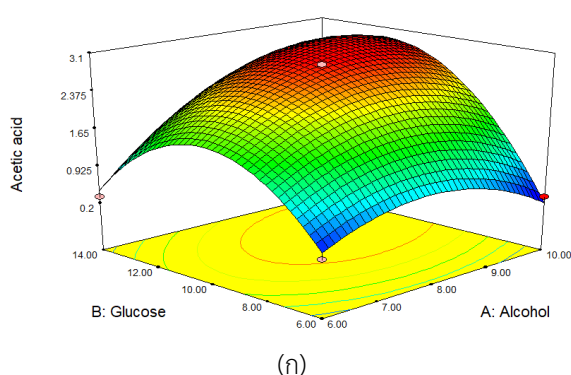
ตารางที่ 3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรดอะซิติกที่ได้จากกระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมัก

Source	Sum of squares	DF	Mean square	F-value	Prob > F	
Model	13.83	9	1.54	4.62	0.0534	Not significant
X_1	1.55	1	1.55	4.65	0.0835	
X_2	2.51	1	2.51	7.54	0.0405	
X_3	0.12	1	0.12	0.35	0.5816	
X_1X_2	1.25	1	1.25	3.77	0.1099	
X_1X_3	0.41	1	0.41	1.23	0.3177	
X_2X_3	0.026	1	0.026	0.077	0.7926	
X_1^2	1.51	1	1.51	4.54	0.0862	
X_2^2	6.83	1	6.83	20.52	0.0062	
X_3^2	0.000	1	0.000	0.000	1.0000	
Residual	1.66	5	0.33			
Lack of fit	1.66	3	0.55			
Pure error	0.000	2	0.000			
Cor total	15.50	14				

Std. Dev. = 0.58, mean = 1.81, R-squared (R^2) = 0.8926, Adj R-squared (Adj R^2) = 0.6993

เข้มข้นของแอลกอฮอล์และปริมาณกลูโคสเพิ่มขึ้น ทำให้ปริมาณกรดอะซิติกจากการหมักมีปริมาณสูงขึ้น จนถึงจุด ๆ หนึ่ง แล้วค่อย ๆ ลดลงมา เมื่อแสดงในลักษณะของกราฟโครงร่างจะเห็นความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของแอลกอฮอล์และปริมาณกลูโคส ส่งผลต่อปริมาณกรดอะซิติกที่ได้จากการหมักมีลักษณะไม่เป็นเส้นตรง ดังรูปที่ 3ข โดยที่เส้นโค้งตรงกลาง (แถบพื้นที่สีส้ม) แสดงถึงปริมาณกรดอะซิติกที่ได้จากการหมักสูงสุดมีค่าร้อยละ 2.59 โดยปริมาตร ส่วนเส้นโค้ง

ถัดออกมา (แถบพื้นที่สี เหลือง เขียว ฟา น้ำเงิน ตามลำดับ) จะแสดงถึงปริมาณกรดอะซิติกที่เริ่มลดลง คือ ร้อยละ 2.11, 1.63, 1.16 และ 0.68 โดยปริมาตร ตามลำดับ ซึ่งการลดลงของกรดอะซิติกอาจเกิดจากแบคทีเรียออกซิโดซิเอทานอลให้เป็นกรดก่อน หลังจากนั้นกลูโคสจึงถูกออกซิไดซ์ [14] และเมื่อกลูโคสมีปริมาณสูงจะทำให้ค่า pH เพิ่มขึ้นด้วย จึงทำให้แบคทีเรียไม่สามารถเจริญเติบโต เนื่องจากแบคทีเรียที่ผลิตกรดอะซิติกจะเจริญได้ดีในช่วง pH 5-6.5 [15]



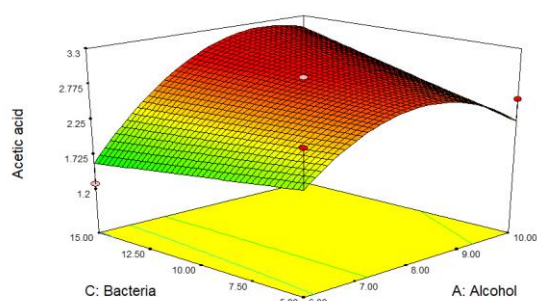
รูปที่ 3 กราฟสามมิติพื้นที่ผิวตอบสนอง (ก) และกราฟโครงร่าง (ข) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแอลกอฮอล์และปริมาณกลูโคสที่ใช้ในการหมัก โดยกำหนดให้ปริมาณแบคทีเรียที่ใช้ซึ่งต่อปริมาณกรดอะซิติก

กราฟสามมิติพื้นที่ผิวตอบสนองของปริมาณกรดอะซิติกที่ได้จากการบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากเนื้อผลกาแฟ ในรูปที่ 4ก ระหว่างค่าความเข้มข้นของแอลกอฮอล์และปริมาณแบคทีเรีย โดยกำหนดให้ปริมาณกลูโคสคงที่ พบว่าเมื่อความเข้มข้นของแอลกอฮอล์และปริมาณแบคทีเรียเพิ่มขึ้น ทำให้ปริมาณกรดอะซิติกที่ได้จากการหมักมีปริมาณสูงขึ้น จนถึงจุด ๆ หนึ่ง แล้วค่อย ๆ ลดลงมา เมื่อแสดงในลักษณะของกราฟโครงร่าง จะเห็นความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของแอลกอฮอล์และปริมาณแบคทีเรีย ส่งผลต่อปริมาณกรดอะซิติกจากการหมักมีลักษณะไม่เป็นเส้นตรง ดังรูปที่ 4ข โดยที่เส้นโค้งตรงกลาง (แถบ

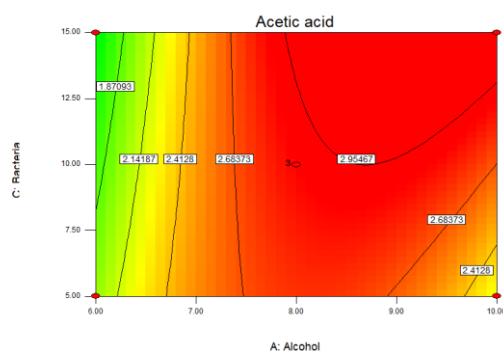
พื้นที่สีส้มเข้ม) แสดงถึงปริมาณกรดอะซิติกที่ได้จากการหมักสูงสุดมีค่าร้อยละ 2.95 โดยปริมาตร ส่วนเส้นโค้งถัดออกมา (แถบพื้นที่สีส้ม เหลือง เขียว ฟา ตามลำดับ) จะแสดงถึงปริมาณกรดอะซิติกที่เริ่มลดลง คือ ร้อยละ 2.68, 2.41, 2.14 และ 1.87 โดยปริมาตร โดยการลดลงของกรดอะซิติกอาจเกิดจากแบคทีเรียสามารถเปลี่ยนแอลกอฮอล์ให้เป็นกรดอะซิติก ในสภาพที่มีออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 15-34 องศาเซลเซียส และเมื่อระยะเวลาการหมักนานขึ้นจะทำให้ปริมาณกรดอะซิติกลดลง ซึ่งเกิดจากการออกซิเดชันเกิน (over-oxidation) เป็นผลทำให้กรดอะซิติกเปลี่ยนเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ [16]

กราฟสามมิติพื้นที่ผิวตอบสนองของปริมาณกรดอะซิติกจากการบวนการหมักน้ำส้มสายชูหมักจากเนื้อผลกาแฟ ในรูปที่ 5ก แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกลูโคสและปริมาณแบคทีเรียที่ใช้ในการหมัก โดยกำหนดให้ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์คงที่ พบว่าเมื่อปริมาณกลูโคสและปริมาณแบคทีเรียเพิ่มขึ้น ทำให้ปริมาณกรดอะซิติกที่ได้จากการหมักมีปริมาณสูงขึ้น จนถึงจุด ๆ หนึ่ง แล้วค่อย ๆ ลดลงมา เมื่อแสดงในลักษณะของกราฟโครงร่างจะเห็นความ

สัมพันธ์ของปริมาณกลูโคสและปริมาณแบคทีเรียส่งผลต่อปริมาณกรดอะซิติกที่ได้จากการหมักมีลักษณะไม่เป็นเส้นตรง ดังรูปที่ 5ข โดยที่เส้นโค้งตรงกลาง (แถบพื้นที่สีส้ม) แสดงถึงปริมาณกรดอะซิติกที่ได้จากการหมักสูงสุดมีค่าร้อยละ 2.66 โดยปริมาตร ส่วนเส้นโค้งถัดออกมา (แถบพื้นที่สีเหลือง เขียว ฟ้า ตามลำดับ) แสดงถึงปริมาณกรดอะซิติกที่เริ่มลดลง คือ ร้อยละ 2.28, 1.90, 1.52 และ 1.14 โดยปริมาตรตามลำดับ

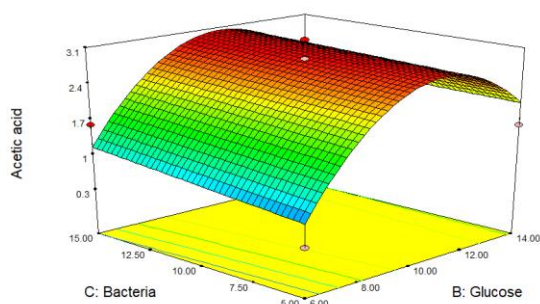


(ก)

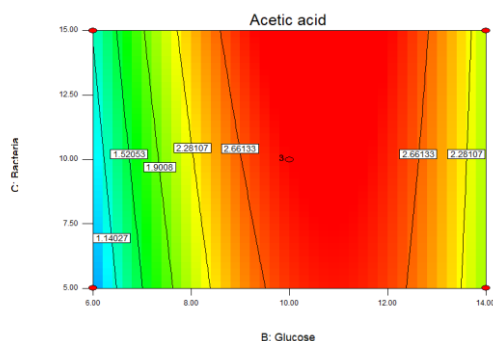


(ข)

รูปที่ 4 กราฟสามมิติพื้นที่ผิวตอบสนอง (ก) และกราฟโครงร่าง (ข) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแอลกอฮอล์และปริมาณแบคทีเรียที่ใช้ในการหมัก โดยกำหนดให้ปริมาณกลูโคสที่ใช้คงที่ต่อปริมาณกรดอะซิติก



(ก)



(ข)

รูปที่ 5 กราฟสามมิติพื้นที่ผิวตอบสนอง (ก) และกราฟโครงร่าง (ข) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกลูโคสที่ใช้และปริมาณแบคทีเรียที่ใช้ในการหมัก โดยกำหนดให้ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์คงที่ต่อปริมาณกรดอะซิติก

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบปริมาณกรดอะซิติกที่ได้จากการทดลองและจากสมการทำนายสภาวะที่เหมาะสมของแบบจำลอง

ที่มาของสภาวะที่เหมาะสม	ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์	ปริมาณน้ำตาลกลูโคส	ปริมาณแบคทีเรีย	ปริมาณกรดอะซิติก
	(%) : X_1	(% w/v) : X_2	(%) : X_3	(%) : Y
แบบจำลอง	8.21	11.93	10.30	2.91
การคำนวณ	8	10	10	2.88
การทดลองจริง	8	12	10	2.99±0.18

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางที่ 3 พบว่าผลการทำนายสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอะซิติกสูงสุดในระหว่างกระบวนการหมักน้ำส้มสายชูจากเนื้อผลกาแฟ จากปัจจัยในการสกัดทั้ง 3 ปัจจัย ดังกล่าวข้างต้น พบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดจากแบบจำลอง คือ ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ร้อยละ 8.21 โดยปริมาตร ปริมาณกลูโคสร้อยละ 11.93 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และปริมาณแบคทีเรียร้อยละ 10.30 โดยปริมาตร มีผลทำให้ปริมาณกรดอะซิติกสูงสุดอยู่ที่ร้อยละ 2.91 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับสภาวะที่เหมาะสมจากการคำนวณและค่าจากสภาวะการทดลองจริง (ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ร้อยละ 8 โดยปริมาตร ปริมาณกลูโคสร้อยละ 12 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และปริมาณแบคทีเรียร้อยละ 10 โดยปริมาตร) ซึ่งมีปริมาณกรดอะซิติกที่ใกล้เคียงกัน คือ ร้อยละ 2.88 และ 2.99 ตามลำดับ สอดคล้องกับ วรารุณี [4] ที่รายงานไว้ว่า อิทธิพลความเข้มข้นของเอทานอลมีผลต่อการผลิตกระบวนการผลิตกรด โดยส่วนใหญ่แล้วความเข้มข้นของเอทานอลจะอยู่ในช่วงร้อยละ 8-12 และยังสามารถคล้องกับ จุฑามณี [17] ที่วิจัยเกี่ยวกับการผลิตน้ำส้มสายชูจากสาโท พบว่าที่ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ร้อยละ 8 ให้ผลการผลิตกรดในปริมาณสูงสุด คือ ร้อยละ 0.70 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ซึ่งต่าง

จากงานวิจัยของ ชญานพิสุทธิ์ และคณะ [18] ที่ผลิตเครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักเพื่อสุขภาพจากน้ำเชื่อมเปลือกสับปะรด โดยปรับความเข้มข้นของเอทานอลเริ่มต้นเป็นร้อยละ 4 (ปริมาตร/ปริมาตร) ในขั้นตอนกระบวนการหมักเพื่อให้ได้กรดอะซิติก โดยใช้แบคทีเรีย *A. aceti* TISTR 102 และ *A. aceti* TISTR 103 ส่งผลให้มีปริมาณกรดอะซิติกสูงสุดอยู่ที่ร้อยละ 3.8 และ 3.2 ตามลำดับ และยังมีงานวิจัยของ ประวีณา และคณะ [19] ที่พัฒนาผลิตภัณฑ์น้ำส้มสายชูหมักจากข้าวเหนียวดักล้อง โดยใช้แบคทีเรีย *A. aceti* TISTR 354 ด้วยวิธีการเขย่าให้อากาศ เป็นเวลา 3 วัน จะได้น้ำส้มสายชูหมักจากข้าวเหนียวดำที่มีปริมาณกรดอะซิติกร้อยละ 5.48 นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ zhao และคณะ [20] ที่ผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากพุทราจีน โดยใช้ปริมาณแบคทีเรีย *A. aceti* ร้อยละ 10 โดยปริมาตร

ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอะซิติกสูงสุดในระหว่างกระบวนการหมักน้ำส้มสายชูจากเนื้อผลกาแฟที่ได้ จากสภาวะการทดลองจริงนี้มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมอยู่ที่ $229.40 \pm 0.882 \text{ mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{DW}}$ ซึ่งสอดคล้องกับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (ค่าร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH) อยู่ที่ร้อยละ 38.21 ± 0.745 [21] นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับ

งานวิจัยของ Liu และคณะ [3] ซึ่งรายงานว่าเนื้อผลกาแฟ (coffee pulp) เป็นหนึ่งในแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ และยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ ชูติมณฑน์ และคณะ [2] ที่ศึกษาฤทธิ์ การต้านออกซิเดชันในรูปของปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด (total polyphenol content, TPC) ของผลกาแฟทั้งผล พบว่าเมล็ดกาแฟ (1.42 %) มีค่า TPC ในรูปของกรดแกลลิก (% gallic acid) ต่อน้ำหนักแห้งสูงที่สุด รองลงมา คือ เนื้อผลกาแฟที่ได้จากโรงงาน (1.22 %) ผลกาแฟ (1.18 %) และเนื้อผลกาแฟสด (0.96 %) ตามลำดับ โดยเนื้อผลกาแฟที่ได้จากโรงงาน มีฤทธิ์การต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์โดยวิธี DPPH (1,212,621 ไมโครโมล โทร็อก (trolox) ต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง) การวิเคราะห์สมบัติทางเคมีและทางกายภาพของน้ำส้มสายชูหมักจากเนื้อผลกาแฟที่ได้พบว่ามีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) อยู่ที่ 3.40 ± 0.02 ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดอยู่ที่ 4 องศาบริกซ์ ปริมาณแอลกอฮอล์อยู่ระหว่างร้อยละ 0.1-0.2 โดยปริมาตร ซึ่งสอดคล้องกับประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 204 เรื่อง น้ำส้มสายชู โดยให้มีแอลกอฮอล์ตกค้าง (residual alcohol) ไม่เกินร้อยละ 0.5 [22] และมีค่าสี ได้แก่ ค่าความสว่าง (L^*) = 0.80 ± 0.05 ค่าความเป็นสีแดง (a^*) = 0.68 ± 0.02 และค่าความเป็นสีเหลือง (b^*) = 0.50 ± 0.05 โดยตัวอย่างน้ำส้มสายชูหมักจากเนื้อผลกาแฟที่ได้มีสีน้ำตาลดำ ซึ่งเป็นไปตามสีของวัตถุดิบที่นำมาใช้ในการวิจัย

4. สรุป

การวิเคราะห์หาสถานะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอะซิติกในระหว่างกระบวนการหมักน้ำส้มสายชูจากเนื้อผลกาแฟเพื่อให้ปริมาณกรดอะซิติกสูงสุดพบว่าที่ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ร้อยละ 8 โดยปริมาตร ปริมาณกลูโคสร้อยละ 12 โดยน้ำหนักต่อ

ปริมาตร และปริมาณแบคทีเรียร้อยละ 10 โดยปริมาตร สามารถผลิตปริมาณกรดอะซิติกได้สูงสุดร้อยละ 2.99 ± 0.18 ภายใต้สภาวะนี้มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม $229.40 \pm 0.882 \text{ mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{DW}}$ ซึ่งมีค่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระร้อยละของการยับยั้งอนุมูลอิสระ 38.21 ± 0.745 และเมื่อตรวจสอบสมบัติทางเคมีและทางกายภาพ พบว่ามีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) 3.40 ± 0.02 ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด 4 องศาบริกซ์ ปริมาณแอลกอฮอล์อยู่ระหว่างร้อยละ 0.1-0.2 และมีค่าสี $L^* = 0.80 \pm 0.05$, $a^* = 0.68 \pm 0.02$ และ $b^* = 0.50 \pm 0.05$

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และบริษัท ฮิลล์คอฟฟี่ จำกัด ภายใต้โครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม (พวอ.) ระดับปริญญาโท ประจำปี 2560 ที่ให้ทุนสนับสนุน และขอขอบคุณสาขาวิชาวิศวกรรมอาหาร และสาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

6. รายการอ้างอิง

- [1] สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, กาแฟ, แหล่งที่มา : http://www.oae.go.th/ewt_news.php?nid=new, 19 เมษายน 2561.
- [2] ชูติมณฑน์ พลอยประดับ, พุทธพร เจียมสุขกิตต์ และนิรมล ปัญญาบุศยกุล, 2553, ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันของส่วนต่าง ๆ ของผลกาแฟอาราบิก้าและกากกาแฟ, ว.วิทยาศาสตร์เกษตร 41(3/1): 577-580.
- [3] Liu, J., Gan, J., Yu, Y., Zhu, S., Yin, L. and Cheng, Y., 2016, Effect of laboratory-scale

- decoction on the antioxidative activity of Zhenjiang Aromatic Vinegar: The contribution of melanoidins, J. Funct. Foods 21: 75-86.
- [4] ปรีชา มุณิศรี, 2538, น้ำส้มสายชูหมักจากไวน์เปรี้ยว (vinegar), ว.ศูนย์บางพระ, 1: 42-46.
- [5] Álvarez-Cáliz, C., Santos-Dueñas, Inés M., García-Martínez, T., Cañete-Rodríguez, Ana M., Millán-Pérez, M. Carmen, Mauricio, Juan C. and García-García, Isidoro., 2014, Effect of biological ageing of wine on its nitrogen composition for producing high quality vinegar, J. Food Bioprod. Proc. 92: 291-297.
- [6] Johnston, Carol S., Quagliano, Samantha and White Serena, 2013, Vinegar ingestion at mealtime reduced fasting blood glucose concentrations in healthy adults at risk for type 2 diabetes, J. Funct. Foods 5: 2007-2011.
- [7] เจนจิรา ชุมภูคำ, วีระพงษ์ ทรัพย์นำ และทัศนัย จารุวัฒนพันธ์, 2557, ผลของอัตราส่วนประกอบต่อคุณภาพของไวน์เปลือกกาแฟและความพึงพอใจของผู้บริโภค, ว.แก่นเกษตร, 42(3)(ฉบับพิเศษ): 415-420.
- [8] เกศินี ตระกูลทิวากร, 2525, การศึกษาความแก่และคุณภาพของผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ที่มีความแตกต่าง ๆ ที่เก็บรักษาในตู้เย็น, สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- [9] Kaisoon, O., Siriamornpun, S., Weerapreeyakul, N. and Meeso, N., 2011, Phenolic compounds and antioxidant activities of edible flowers from Thailand, J. Funct. foods 3: 88-99.
- [10] Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K. and Nakamura, T., 1992, Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion, J. Agric. food chem. 40: 945-948.
- [11] มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน, ไวน์ผลไม้, แหล่งที่มา : <http://tcps.tisi.go.th/public/StandardList.aspx>, 20 เมษายน 2561.
- [12] Narkprasom, N., Narkprasom, K. and Upara, U., 2015, Optimization of total phenolic from *Cleistocalyx nervosum* by microwaveassisted extraction, Amer. J. Eng. Appl. Sci. 8: 302-309.
- [13] วราวุฒิ ครูสูง และพงสวัสด์ มานิต, 2532, เทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม, โอ เอส พริ้นติ้งเฮาส์, กรุงเทพฯ.
- [14] Sakurai, K., Yamazaki, S., Ishii, M., Igarashi, Y. and Arai, H., 2013, Role of the glyoxylate pathway in acetic acid production by *Acetobacter aceti*, J. Biosci. Bioeng. 115: 32-36.
- [15] ประมวล ทรายทอง, บทบาทของแบคทีเรียกรดอะซิติกในอุตสาหกรรมอาหาร, แหล่งที่มา : <http://158.108.94.117/Public/PUB0629.pdf>, 10 กรกฎาคม 2561.
- [16] ชื่นจิต จันทจรูญพงษ์, นัชดา ราชนิยม และณัฐวัลย์ พลพันธ์, 2561, การศึกษากระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากโคจิข้าวเหนียว, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวชิร 8(1): 130-140.
- [17] จุฑามาศ มณีวงศ์, 2551, การผลิตน้ำส้มสายชู

- จากสาโท, รายงานการวิจัย, มหาวิทยาลัยแม่โจ้, เชียงใหม่, 42 น.
- [18] ชญาน์พิสุทธิ์ แก้วสุวรรณ, นรรัตน์ เทียนชัย ทัศน์, สุดาวดี มโนรมณ์ และหนึ่งฤทัย ห้าวหาญ, 2555, การผลิตเครื่องดื่มน้ำส้มสายชูหมักเพื่อสุขภาพจากน้ำเชื่อมเปลือกสับปะรด, รายงานการวิจัย, มหาวิทยาลัยราชภัฏจลัญญบุรี, ปทุมธานี, 65 น.
- [19] ประวีณา ลาภา, เพ็ญขวัญ ชมปรีดา, และวิชัย หฤทัยธนาสันต์, 2544, การพัฒนามลิตภัณฑ์ น้ำส้มสายชูหมักข้าวกล้องเหนียวดำ, รายงานการวิจัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ, 8 น.
- [20] Zhao, L., Liu, F., Wu, L., Xue, X. and Hou, F., 2017, Fate of triadimefon and its metabolite triadimenol in jujube samples during jujube wine and vinegar processing, Food Control 73: 468-473.
- [21] กาญจนา นาคประสม, จตุรภัทร วาฤทธิ์, อุมพร อุประ, หยาดฝน ทนงการกิจ และนักรบ นาคประสม, 2560, สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกรวมจากดอกบัวหลวง โดยใช้เทคนิคสกัดด้วยไมโครเวฟ, ว.วิทยาศาสตร์ มข. 45(2): 328-342.
- [22] ประกาศกระทรวงสาธารณสุข, น้ำส้มสายชูหมัก, แหล่งที่มา : http://food.fda.moph.go.th/law/data/announ_moph/P204.pdf, 9 กรกฎาคม 2561.