

สภาวะการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากเปลือกกาแฟเชอร์รี่ที่อุดมด้วย สารต้านอนุมูลอิสระเพื่อสุขภาพ

พัทธนันท์ นาทพินิจ*

¹สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

*E-mail: patthanant_n@tistr.or.th

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาน้ำส้มสายชูหมักจากแอลกอฮอล์ที่ได้จากการหมักเปลือกกาแฟเชอร์รี่ โดยมุ่งเน้นในการสร้างเครื่องต้มไฮเดรตที่มีสารสำคัญในการต้านอนุมูลอิสระ การศึกษาผลของปัจจัยในกระบวนการผลิต กรดอะซิติก เช่น ชนิดของสายพันธุ์จุลินทรีย์ ปริมาณแอลกอฮอล์และน้ำตาลเริ่มต้น แอลกอฮอล์ที่ใช้มีปริมาณ ตั้งแต่ 13-15% ถูกเจือจางให้มีความเข้มข้นในช่วง 3-12% เพื่อนำไปหมักเป็นกรดอะซิติก โดยการเปรียบเทียบหัวเชื้อ *Acetobacter pasteurianus* สายพันธุ์ TISTR 102 และ TISTR 521 ซึ่งสามารถผลิตกรดอะซิติกได้มากกว่า 4.5% ผลลัพธ์ที่ได้มีสารประกอบฟีนอลิก 715 มก.ก.กรดกลูกลิคต่อมล. น้ำส้มสายชูหมัก และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ในรูปแบบ DPPH เท่ากับ 21.27 มก.ก.กรดแอสคอร์บิกต่อมล. น้ำส้มสายชูหมัก ซึ่งแสดงถึงฤทธิ์ยับยั้งที่ 8.36% ขณะเดียวกันฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในรูปแบบ FRAP มีค่า 38.79 มก.สมมูลเฟอร์รัสซัลเฟตต่อกรัมเปลือกกาแฟ และ 139 มก.ก.สมมูลเฟอร์รัสซัลเฟตต่อมล.น้ำส้มสายชูหมัก ตามลำดับ ผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ในรูปแบบ FRAP มีประสิทธิภาพสูงกว่าฤทธิ์ในรูปแบบ DPPH ซึ่งแสดงถึงศักยภาพในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ ที่มีคุณค่าทางโภชนาการและสุขภาพในอนาคต

คำสำคัญ: น้ำส้มสายชูหมัก เปลือกกาแฟเชอร์รี่ สารต้านอนุมูลอิสระ การทดสอบ DPPH การทดสอบ FRAP

* Corresponding author, e-mail: patthanant_n@tistr.or.th

Production Conditions of Antioxidant-Rich Vinegar from Coffee Cherry Peels for Health

Patthanant Natpinit*

Thailand Institute of Scientific and Technological Research

*E-mail: patthanant_n@tistr.or.th

Abstract

This investigation aimed to develop vinegar fermented from alcohol derived from the fermentation of coffee cherry husks, focusing on creating a cider beverage rich in antioxidants. The study examined the effects of various factors on acetic acid production, such as the type of microbial strain used, the initial alcohol concentration, and the sugar quantity. Alcohol with a concentration of 13-15% was diluted to levels ranging from 3-12% for fermentation into acetic acid. The strains of *Acetobacter pasteurianus*, specifically TISTR 102 and TISTR 521, were compared, both of which produced more than 4.5% acetic acid. The resulting product contained phenolic compounds at 715 ug gallic acid per ml of vinegar. It exhibited antioxidant activity in the DPPH assay at 21.27 ug ascorbic acid per ml of vinegar, demonstrating an inhibition rate of 8.36%. Similarly, the antioxidant activity in the FRAP assay was measured at 38.79 mg of ferrous sulfate per gram of coffee husk and 139 ug of ferrous sulfate per ml of vinegar. The results indicated that the antioxidant activity assessed by the FRAP method was more effective than that determined by the DPPH method, highlighting the potential for developing this product as a nutritionally valuable and health-promoting option in the future.

Keywords: Vinegar, cherry coffee peel, antioxidants, DPPH Assay, FRAP Assay

* Corresponding author, e-mail: patthanant_n@tistr.or.th

1. ที่มาและความสำคัญ

การผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากเปลือกกาแฟเชอร์รี่ เริ่มต้นจากแนวคิดในการใช้ประโยชน์จากทรัพยากรที่มีอยู่ในอุตสาหกรรมกาแฟ ซึ่งเปลือกกาแฟมักถูกทิ้งเป็นของเสียหลังการผลิต การนำเปลือกกาแฟมาใช้ในการกระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักไม่เพียงแต่ช่วยลดของเสีย แต่ยังเพิ่มมูลค่าให้กับผลิตภัณฑ์เหล่านี้อีกด้วย สารต้านอนุมูลอิสระจากเปลือกกาแฟเชอร์รี่สามารถช่วยป้องกันเซลล์จากการถูกทำลาย และช่วยส่งเสริมสุขภาพและลดความเสี่ยงต่อโรคเรื้อรัง ซึ่งน้ำส้มสายชูหมักจากเปลือกกาแฟมีคุณสมบัติที่เป็นเอกลักษณ์และสามารถใช้ในการปรุงอาหารหรือเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์สุขภาพได้ นอกจากนี้การใช้ผลผลิตจากกาแฟในลักษณะนี้สนับสนุนการเกษตรกรรมที่ยั่งยืนและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ในการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากเปลือกกาแฟเชอร์รี่นั้นจึงเป็นการตอบโจทย์ทั้งด้านเศรษฐกิจ สังคม และสิ่งแวดล้อมอย่างมีประสิทธิภาพ

เปลือกกาแฟเชอร์รี่มีสารสำคัญที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง ซึ่งมีสารสำคัญหลายชนิดที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น คาร์โบไฮเดรตที่ให้พลังงาน โปรตีนที่มีบทบาทในการเสริมสร้างและซ่อมแซมเนื้อเยื่อ แอนโธไซยานินซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ช่วยเสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกันและป้องกันการอักเสบ แทนนินช่วยป้องกันเซลล์จากความเสียหายที่เกิดจากอนุมูลอิสระ ซึ่งอาจช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดโรคเรื้อรัง และช่วยลดอาการท้องเสียและเพิ่มการย่อยอาหาร ส่วนโพลีฟีนอลเป็นสารต้านอนุมูลอิสระช่วยกระตุ้นการทำงานของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน ช่วยลดการอักเสบและการเกิดออกซิเดชันในหลอดเลือด และมีส่วนช่วยในการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดและช่วยเพิ่มการเผาผลาญ นอกจากนี้ยังมีคาเฟอีนที่ช่วยกระตุ้นระบบประสาทกลาง ทำให้รู้สึกสดชื่นและตื่นตัว และช่วยเพิ่มอัตราการเผาผลาญพลังงานในร่างกาย เป็นต้น [1]

สารสกัดจากเปลือกกาแฟเชอร์รี่ ส่วนใหญ่อยู่ในรูปของสารฟีนอลิกซึ่งประกอบไปด้วยกรดคลอโรจีนิกและเอพิกาเทชิน ซึ่งมีปริมาณสูงถึง 42.2% และ 21.6% ตามลำดับ ซึ่งมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่สูงมาก โดยมีค่า ORAC (Oxygen Radical Antioxidant Capacity) สูงกว่าวิตามินอีถึง 15,000 เท่า [2] ซึ่งแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพที่เหนือกว่าของสารสกัดนี้ในการปกป้องเซลล์จากความเสียหายที่เกิดจากอนุมูลอิสระ ประโยชน์ของสารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้มีผลต่อสุขภาพ โดยเฉพาะช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดเซลล์มะเร็ง โดยลดการอักเสบและความเครียดออกซิเดชันในร่างกาย [3] ช่วยป้องกันโรคหัวใจและหลอดเลือด โดยลดความเสี่ยงของการเกิดโรคหัวใจด้วยการลดไขมันไม่ดี (LDL) และเพิ่มระดับไขมันดี (HDL) รวมถึงช่วยปรับสมดุลความดันโลหิต [4]. ซึ่งสามารถช่วยลดการสะสมของไขมันในร่างกาย ควบคุมความอ้วนโดยเพิ่มอัตราการเผาผลาญให้มากขึ้น [5] และช่วยควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด ซึ่งสารฟีนอลิกเหล่านี้ช่วยเพิ่มการตอบสนองต่ออินซูลินและลดความต้านทานต่ออินซูลิน ซึ่งมีส่วนช่วยในการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด [6].

นอกจากนี้ เปลือกกาแฟเชอร์รียังมีศักยภาพในการนำไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ ซึ่งนอกจากจะสร้างมูลค่าเพิ่ม ยังเป็นทางเลือกในการนำวัตถุดิบเหล่านี้มาใช้ในการอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพได้อย่างมีประสิทธิภาพด้วย การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับประโยชน์ต่าง ๆ ของเปลือกกาแฟมีแนวโน้มที่สามารถพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ใหม่ ๆ เพื่อให้ผู้บริโภคได้รับประโยชน์ด้านสุขภาพอย่างเต็มที่.

ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตน้ำส้มสายชูหมักที่มีสารต้านอนุมูลอิสระจากเปลือกกาแฟเชอริพันธุ์ราบิก้า ที่มีสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นสารฟีนอลิก ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง โดยศึกษาหาปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการผลิต ได้แก่ ชนิดของสายพันธุ์จุลินทรีย์ ปริมาณแอลกอฮอล์และน้ำตาลเริ่มต้น เพื่อให้ได้แนวทางการเพิ่มมูลค่าให้กับเปลือกกาแฟเชอริเป็นผลิตภัณฑ์น้ำส้มสายชูหมักเพื่อสุขภาพที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในการจำหน่ายเชิงพาณิชย์ต่อไป

2. วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาน้ำส้มสายชูหมักจากแอลกอฮอล์ที่ได้จากการหมักเปลือกกาแฟเชอริ ที่มีสาระสำคัญในการต้านอนุมูลอิสระ

3. ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

น้ำส้มสายชูหมักสามารถผลิตได้จากวัตถุดิบหลายชนิด เช่น ผลไม้ ธัญพืช แป้ง น้ำตาล หรือแอลกอฮอล์ เป็นต้น โดยส่วนใหญ่จะเป็นการหมักเอทานอลที่ได้มาจากการใช้ยีสต์หมักวัตถุดิบดังกล่าว แล้วจึงนำมาหมักต่อด้วย acetobacter เพื่อให้ได้กรดอะซิติก [7] ในสภาวะที่มีออกซิเจน น้ำส้มสายชูหมักที่ได้จะใส และมีกลิ่นหอมตามวัตถุดิบ การผลิตน้ำส้มสายชูหมัก ทำได้หลายวิธี ขึ้นกับวัตถุดิบตั้งต้นที่เลือกใช้ เช่น การผลิตน้ำส้มสายชูจากไวน์ ผลไม้ต่าง ๆ ข้าวมอลต์ และแอลกอฮอล์ [8] มันเทศ หรือข้าวโพด [9] เป็นต้น

กระบวนการหมักน้ำส้มสายชู มีการหมักหลายแบบ เช่น การหมักแบบครั้งเดียว (batch) จะเป็นการหมักที่มีการเติมอาหารเพียงครั้งเดียว และทำการเก็บน้ำหมักหลังจากสิ้นสุดกระบวนการหมักตามระยะเวลาที่กำหนด [10,11] การหมักแบบต่อเนื่องเป็นการหมักที่มีการเติมอาหารระหว่างกระบวนการหมักและมีการเก็บน้ำหมักพร้อม ๆ กัน โดยมีอัตราการเก็บน้ำหมักเท่ากับอัตราการเติมอาหารใหม่ [12] และการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง โดยมีการเก็บเกี่ยวน้ำหมักออกไปก่อนที่จะมีการเติมสารอาหารใหม่ โดยจะควบคุมปริมาณแอลกอฮอล์ที่ใช้เลี้ยงให้คงที่ โดยการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องนี้จะต้องคำนึงถึงปริมาณแอลกอฮอล์ที่ตั้งต้น และปริมาณกรดอะซิติกที่เกิดขึ้นว่ามีอัตราส่วนที่เหมาะสมไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อการทำงานของแบคทีเรียกลุ่ม acetobacter เนื่องจากปริมาณแอลกอฮอล์และกรดอะซิติกที่มากเกินไปจะส่งผลยับยั้งการทำงานของแบคทีเรีย

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการหมักน้ำส้มสายชู ส่วนใหญ่เป็นกลุ่มของ *Acetobacter sp.* และ *Gluconobacter sp.* โดยนิยมกลุ่ม acetobacter มากกว่า เนื่องจากให้ปริมาณกรดอะซิติกที่สูงกว่า ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถออกซิไดซ์เอทานอลให้เป็นกรดอะซิติกได้โดยภายใต้สภาวะที่มีอากาศ [13] ได้แก่ *Acetobacter aceti* [14] *Acetobacter rancens* [15] *Acetobacter europaeus*, *Acetobacter xylinum*, *Acetobacter diazotrophicus*, *Acetobacter hansenii*, *Acetobacter liquefaciens* [16] *Acetobacter pasteurianus*, *Acetobacter peroxydans* [13] *Gluconobacter sp.* [17]

ความเข้มข้นของเอทานอลที่เหมาะสมจะเริ่มต้นใช้ที่ 13 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของกรดอะซิติกอยู่ที่ 10 กรัมต่อลิตร ซึ่งในการหมักน้ำส้มสายชูเป็นปฏิกิริยาที่ต้องการออกซิเจน เนื่องจากแบคทีเรียที่ผลิตกรดอะซิติก จะทำการออกซิไดซ์เอทานอลเปลี่ยนไปเป็นกรดอะซิติกในสภาวะที่มีอากาศ ซึ่งโดยปกติแล้วอัตราการไหลของอากาศ จะใช้ที่อัตราการไหลของอากาศ 150 ลิตรต่อนาที่ โดยมีความเข้มข้นของออกซิเจนอยู่ที่ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนอุณหภูมิที่ใช้ในการหมักที่เหมาะสมกับแบคทีเรียผลิตกรดน้ำส้มสายชูจะอยู่ในช่วง 30-31 องศาเซลเซียส ส่วนการเก็บผลิตภัณฑ์น้ำส้มสายชูนั้น จะเก็บในช่วงที่มีความเข้มข้นของกรดอะซิติกอยู่ที่ 70-80 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของเอทานอลไม่เกิน 8 กรัมต่อลิตร [14]

การวิเคราะห์สารฟีนอลิกในเปลือกกาแฟเชอร์รี่แสดงให้เห็นว่ามีปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดอยู่ในช่วง 0.39-2.83 มก.กรดแกลลิกต่อกรัมเปลือกกาแฟ สารฟีนอลิกเหล่านี้มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ทั้งในรูปแบบ DPPH และ FRAP เมื่อนำสารสกัดไปทดสอบด้วยวิธี DPPH พบว่า มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูง โดยสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก ทั้งในระดับ IC_{50} และ IC_{100} ซึ่งมีค่าอยู่ที่ 143 และ 285 มก.ก.กรดแอสคอร์บิกต่อมล. ตามลำดับ [18] ผลการศึกษาเหล่านี้ชี้ให้เห็นถึงศักยภาพของสารฟีนอลิกในเปลือกกาแฟเชอร์รี่ในการทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูง

จากการหมักเปลือกกาแฟเชอร์รี่เพื่อผลิตแอลกอฮอล์ พบว่า มีปริมาณสารฟีนอลิกอยู่ที่ 33.56 มก.กรดแกลลิกต่อกรัมเปลือกกาแฟ นอกจากนี้ยังแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในรูปแบบ DPPH ที่ 11.88 มก.กรดแอสคอร์บิกต่อกรัมเปลือกกาแฟ โดยมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระถึง 32.42% ในขณะที่ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในรูปแบบของ FRAP เท่ากับ 7.55 มก.สมมูลเฟอร์รัสซัลเฟตต่อกรัมเปลือกกาแฟ หรือประมาณ 4.3 มก.กรดแอสคอร์บิกต่อกรัมเปลือกกาแฟ [19] ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในรูป DPPH สูงกว่าในรูป FRAP ซึ่งบ่งชี้ว่าผลิตภัณฑ์จากเปลือกกาแฟเชอร์รี่หรือสารฟีนอลิกมีกลไกออกฤทธิ์ที่มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ โดยมีกลไกการออกฤทธิ์แบบแลกเปลี่ยนไฮโดรเจน (hydrogen) ที่มีประสิทธิภาพมากกว่าการเป็นสารต้านออกซิเดชันหรือการให้อิเล็กตรอน [20]

4. วิธีดำเนินการวิจัย

4.1 การศึกษาสภาวะการหมักน้ำส้มสายชู (กรดอะซิติก)

4.1.1 การเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์สำหรับผลิตน้ำส้มสายชูหมัก

ทำการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์จากหลอดเชื้อแห้งแข็ง โดยนำเชื้อจุลินทรีย์ สายพันธุ์ *Acetobacter pasteurianus* TISTR 102 และ *Acetobacter pasteurianus* TISTR 521 ที่เก็บอยู่ในหลอดเชื้อแห้งแข็ง มาเพาะเลี้ยงในจานเพาะเชื้อ โดยใช้อาหารเหลว GYEB ที่ประกอบด้วย กลูโคส 100 กรัม yeast extract 10 กรัม แคลเซียมคาร์บอเนต 20 กรัม และน้ำกลั่น 1 ลิตร โดยนำเชื้อจุลินทรีย์ออกจากหลอดเชื้อแห้ง โดยใช้อาหารเหลว 5 มิลลิลิตร ชะล้างเชื้อจุลินทรีย์ออกมาจากหลอดเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นำมาเจือจางด้วยสารละลายเกลือปลอดเชื้อ โดยปรับความขุ่นของสารละลายหัวเชื้อที่ 10^8 CFU/ml และปิเปตสารละลายหัวเชื้อ

ที่ปรับความขุ่นแล้ว 10 มล. ใส่ลงในขวดอาหารเหลว GYEB ปริมาตร 100 มล. แล้วนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้งาน

4.1.2 การกระตุ้นหัวเชื้อจุลินทรีย์ก่อนนำไปใช้

การเตรียมหัวเชื้อ *acetobacter สายพันธุ์ TISTR 102 หรือ 521* โดยนำหัวเชื้อที่เลี้ยงไว้ มาเลี้ยงกระตุ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สูตรอาหารจากน้ำมะพร้าว 250 มล. ผสมกับยีสต์สกัด 0.5 กรัม และเติมเอทานอล 95% 7 มล. เขย่าตลอดเวลา เป็นระยะเวลา 24-72 ชั่วโมง ซึ่งจะได้เชื้อจุลินทรีย์ที่มีความเข้มข้นประมาณ $5 \times 10^7 - 10^8$ จำนวนเซลล์ต่อมล. (CFU/ml)

4.1.3 การเตรียมน้ำหมักสำหรับผลิตน้ำส้มสายชู

สูตรน้ำหมักที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการหมักน้ำส้มสายชู ประกอบด้วยไวน์จากเปลือกกาแฟเชอร์รี่ ปรับให้มีความเข้มข้นแอลกอฮอล์ในช่วง 3-15% ด้วยการเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการกรองอุลตราฟิเตอร์ เติมนิโคตโมเนียมฟอสเฟต หรือ DAP ในอัตราส่วน 0.5 กรัมต่อลิตร จากนั้นปรับพีเอชให้ได้ 6-6.5 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

4.1.4 ศึกษาประสิทธิภาพการหมักกรดอะซิติก

4.1.4.1 ศึกษาปริมาณแอลกอฮอล์ที่ใช้เริ่มต้นในการหมัก

นำน้ำหมักที่ได้จากข้อ 4.1.3 เติมน้ำลงในขวดชมพู ขนาด 250 มล. อย่างละ 100 มล. จำนวน 6 ชุด ๆ ละ 3 ขวด โดยแบ่งเป็น ชุดควบคุม, ชุดที่มีแอลกอฮอล์ 3%, ชุดที่มีแอลกอฮอล์ 6%, ชุดที่มีแอลกอฮอล์ 9%, ชุดที่มีแอลกอฮอล์ 12% และชุดที่มีแอลกอฮอล์ 15% แล้วนำมาเติมเชื้อจุลินทรีย์ TISTR 102 ในอัตรา 10% โดยปริมาตร จากนั้นหมักทิ้งไว้ เป็นระยะเวลา 7, 14 และ 21 วัน เก็บตัวอย่าง ครั้งละ 5 มล. นำไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะซิติกที่ผลิตได้ ทำซ้ำสำหรับใช้หัวเชื้อ TISTR 521

4.1.4.2 ศึกษาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก

นำน้ำหมักที่ได้จากข้อ 4.1.3 เจือจางให้ได้แอลกอฮอล์ ที่ 6% และ 15% เติมน้ำลงในขวดชมพู ขนาด 250 มล. อย่างละ 100 มล. จำนวน 7 ชุด ๆ ละ 3 ขวด โดยแบ่งเป็นชุดควบคุม, ชุดที่มีแอลกอฮอล์ 6% หัวเชื้อจุลินทรีย์ 5%, ชุดที่มีแอลกอฮอล์ 6%, หัวเชื้อจุลินทรีย์ 10%, ชุดที่มีแอลกอฮอล์ 6%, หัวเชื้อจุลินทรีย์ 15%, ชุดที่มีแอลกอฮอล์ 15%, หัวเชื้อจุลินทรีย์ 5%, ชุดที่มีแอลกอฮอล์ 15%, หัวเชื้อจุลินทรีย์ 10% และชุดที่มีแอลกอฮอล์ 15% หัวเชื้อจุลินทรีย์ 15% จากนั้นหมักทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 7 และ 14 วัน เก็บตัวอย่าง ครั้งละ 5 มล. นำไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะซิติกที่ผลิตได้ ใช้หัวเชื้อ TISTR 102 ทำซ้ำโดยใช้หัวเชื้อ TISTR 521

4.1.4.3 ศึกษาปริมาณน้ำตาลที่ใช้เริ่มต้นในการหมัก

นำน้ำหมักที่ได้จากข้อ 4.1.3 เจือจางให้ได้แอลกอฮอล์ ที่ 12% เติมน้ำลงในขวดชมพู ขนาด 250 มล. อย่างละ 100 มล. จำนวน 3 ชุด ๆ ละ 3 ขวด โดยแบ่งเป็น ชุดที่มีน้ำตาล 5 %ปริกซ์, ชุดที่มีน้ำตาล 10 %ปริกซ์ และชุดที่มีน้ำตาล 15 %ปริกซ์ แต่ละชุดเติมเชื้อจุลินทรีย์ TISTR 102 5% โดยปริมาตร จากนั้นหมักทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 7 และ 14 วัน เก็บตัวอย่าง ครั้งละ 5 มล. นำไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะซิติกที่ผลิตได้ ทำซ้ำโดยใช้หัวเชื้อ TISTR 521



รูปที่ 1 ขั้นตอนการหมักน้ำส้มสายชู

4.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด โดยใช้วิธี Folin-ciocalteu colorimetric ดัดแปลงจากวิธีการของ [21]

เตรียมสารละลายกรดแกลลิก ที่มีความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 มก./มล. เตรียมสารละลายทดสอบ โดยใช้สารละลาย NaCO_3 2% (w/v) 2 มล. เติมสารละลายตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐาน 0.1 มล. เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเติม Folin-Ciocalteu reagent 0.1 มล. ทิ้งไว้ในที่มืด 1 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร สีของสารวิเคราะห์แสดงได้ดังรูปที่ 2 แล้วนำไปสร้างเส้นกราฟมาตรฐานจากการตรวจวัดกรดแกลลิก

4.3 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (DPPH radical scavenging assay) ดัดแปลงจากวิธีการของ [22]

เตรียมสารละลาย 2, 2 diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 0.1 มิลลิโมล โดยชั่งน้ำหนัก 0.004 กรัม ละลายในเอทานอล 95% 100 มล. เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก ที่ความเข้มข้น 25, 50, 100, 125, 200 และ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปเจือจางตามความเข้มข้นที่กำหนดไว้ ปิเปตสารละลาย DPPH 2.9 มล. เติมสารละลายมาตรฐาน หรือสารละลายตัวอย่าง 0.1 มล. เขย่าและทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร สีของสารวิเคราะห์แสดงได้ดังรูปที่ 2. แล้วนำไปสร้างเส้นกราฟมาตรฐานจากการตรวจวัดกรดแอสคอร์บิก

4.4 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (FRAP assay) ดัดแปลงจากวิธีการของ [23]

เตรียมสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ ที่พีเอช 3 เตรียมสารละลาย FRAP reagent โดยมีส่วนประกอบ 3 ส่วน ส่วนที่ 1 ชั่งเฟอร์ริกคลอไรด์ 0.054 กรัม ละลายในน้ำ 10 มล. ส่วนที่ 2 ชั่ง TPTZ (2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine) 0.031 กรัม ละลายในกรดไฮโดรคลอริก 40 มิลลิโมลาร์ หรือ 0.04 โมลาร์ 10 มล. ส่วนที่ 3 สารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ ที่พีเอช 3 100 มล. เตรียมสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัส ที่ความเข้มข้น 100, 200, 400, 600, 800 และ 1,000 ไมโครโมล โดยเจือจางจากสารละลายมาตรฐานเฟอร์รัส 20 มิลลิโมล ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 40 มิลลิโมลาร์ เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก ที่ความเข้มข้น 25, 50, 100, 125, 200 และ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปตสารละลาย FRAP 0.95 มล. เติมสารละลายมาตรฐาน หรือสารละลายตัวอย่าง 0.05 มล. เขย่าและทิ้งไว้ในที่มืด 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร สีของสารวิเคราะห์แสดงได้ดังรูปที่ 2. แล้วนำไปสร้างเส้นกราฟมาตรฐานจากการตรวจวัดสารมาตรฐานเฟอร์รัส



ก. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

ข. สีการทดสอบ phenolic, DPPH, FRAP

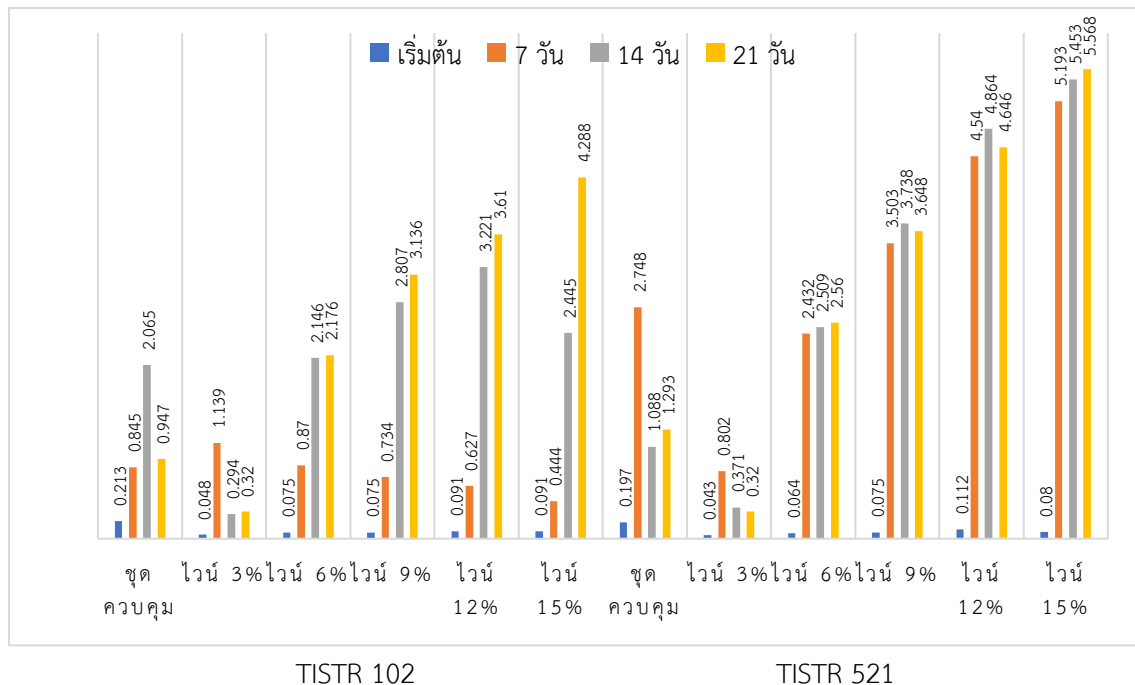
รุ่น Fluostar Omega, BMG Labtech

รูปที่ 2 การทดสอบสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP

5. ผลและวิจารณ์

5.1 ศึกษาปริมาณแอลกอฮอล์ที่ใช้เริ่มต้นในการหมัก

จากรูปที่ 3 พบว่า เมื่อปริมาณแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้น ปริมาณกรดอะซิติกก็มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะเมื่อใช้หัวเชื้อ TISTR 521 ซึ่งให้ปริมาณกรดอะซิติกสูงกว่าหัวเชื้อ TISTR 102 ในทุกระยะเวลา (7, 14 และ 21 วัน) อย่างไรก็ตาม เมื่อเวลาผ่านไปปริมาณกรดอะซิติกเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย โดยเฉพาะเมื่อปริมาณแอลกอฮอล์อยู่ที่ 6% ขึ้นไป แต่ที่ปริมาณแอลกอฮอล์ 3% หลังจาก 7 วัน พบว่ากรดอะซิติกสูงสุดอยู่ที่ 1.139% และ 0.802% สำหรับ TISTR 102 และ TISTR 521 ตามลำดับ ซึ่งมีแนวโน้มลดลงใน 14 และ 21 วัน สาเหตุเกิดจากที่ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ต่ำ จุลินทรีย์ไม่สามารถเปลี่ยนแอลกอฮอล์เป็นกรดอะซิติกได้มากนัก และต้องใช้กรดอะซิติกที่ผลิตได้เป็นอาหาร ซึ่งทำให้ปริมาณกรดอะซิติกลดลง ขณะเดียวกัน จุลินทรีย์ที่ผลิตกรดอะซิติกจะออกซิไดซ์เอทานอลเป็นกรดอะซิติกและอาจทำให้กรดอะซิติกถูกเปลี่ยนเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำเมื่อระยะเวลาในการหมักนานขึ้น [24]



รูปที่ 3 ปริมาณกรดอะซิติกที่ได้จากความเข้มข้นของแอลกอฮอล์แตกต่างกันด้วยเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด

หัวเชื้อ TISTR 102 ในการหมักที่มีแอลกอฮอล์ 6% สามารถผลิตกรดอะซิติกได้ โดยปริมาณกรดอะซิติกเพิ่มขึ้นจาก 0.870% เป็น 2.146% และ 2.176% ในระยะเวลา 7, 14 และ 21 วัน ตามลำดับ ส่วนน้ำหมักที่มีแอลกอฮอล์ 9%, 12% และ 15% หัวเชื้อ TISTR 102 ผลิตกรดอะซิติกได้ 0.734%, 0.627%, และ 0.444% ใน 7 วัน ตามลำดับ และเพิ่มขึ้นเป็น 2.807%, 3.221%, และ 2.445% ใน 14 วัน ก่อนจะเพิ่มเป็น 3.136%, 3.61%, และ 4.288% ใน 21 วัน แสดงให้เห็นว่า TISTR 102 สามารถผลิตกรดอะซิติกได้ดีขึ้นเมื่อปริมาณแอลกอฮอล์สูงขึ้นและระยะเวลานานขึ้น ซึ่งบ่งชี้ว่าจุลินทรีย์สามารถอยู่รอดและผลิตกรดอะซิติกในสภาวะที่มีแอลกอฮอล์สูงได้ โดยอัตราการเจริญของเชื้อ *Acetobacter aceti* เหมาะสมที่สุดที่ความเข้มข้นของเอทานอลประมาณ 13 กรัมต่อลิตร และกรดอะซิติกประมาณ 10 กรัมต่อลิตร [25]

หัวเชื้อ TISTR 521 ในการหมักที่มีแอลกอฮอล์ 6% ผลิตกรดอะซิติกได้ 2.432%, 2.509%, และ 2.560% ในระยะเวลา 7, 14, และ 21 วัน ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าหัวเชื้อ TISTR 102 อย่างไรก็ตาม การเพิ่มขึ้นของกรดอะซิติกเมื่อเวลาผ่านไปมีน้อยมาก นอกจากนี้ TISTR 521 ยังแสดงความสามารถในการผลิตกรดอะซิติกมากขึ้นเมื่อมีปริมาณแอลกอฮอล์สูงขึ้น ในระดับแอลกอฮอล์ 6%, 9%, 12%, และ 15% แต่จะมีการลดลงเมื่อระดับพีเอชต่ำลง ทำให้จุลินทรีย์ถูกยับยั้ง เนื่องจากจุลินทรีย์เหล่านี้เจริญเติบโตได้ดีในช่วงพีเอช 5-6.5 [26] ในระยะเวลา 7 วัน TISTR 521 ผลิตกรดอะซิติกได้ 2.432%, 3.503%, 4.54%, และ 5.193% สำหรับแอลกอฮอล์ 6%, 9%, 12%, และ 15% ตามลำดับ และมีค่าที่เพิ่มขึ้นในระยะเวลา 14 และ 21 วัน แต่การเพิ่มขึ้นของกรดอะซิติกเมื่อเวลานานขึ้นมีน้อยมาก

จากผลการวิจัย พบว่า TISTR 102 ควรใช้เวลาในการหมักอย่างน้อย 14 วัน ในน้ำหมักที่มีแอลกอฮอล์ 9%

หรือ 12% ขณะที่ TISTR 521 สามารถหมักในเวลา 7 วันในน้ำหมักที่มีแอลกอฮอล์ 12% หรือ 15% เพื่อให้ได้กรดอะซิติกสูงสุด

จากสมการเคมี (1) ในการเปลี่ยนแอลกอฮอล์ไปเป็นกรดอะซิติก ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน แสดงได้ดังนี้



จะเห็นว่า แอลกอฮอล์ 1 โมล สามารถเปลี่ยนไปเป็นกรดอะซิติกได้ 1 โมล ดังนั้น ปริมาณแอลกอฮอล์เริ่มต้นที่ใช้ในการหมักสามารถนำมาคำนวณหาปริมาณกรดอะซิติกที่ได้ตามทฤษฎี แสดงได้ดังตารางที่ 1 และสามารถคำนวณร้อยละการเปลี่ยนรูป (%conversion) เพื่อหาประสิทธิภาพในการหมักกรดอะซิติก

ตารางที่ 1 ร้อยละการเปลี่ยนรูป (%conversion) จากการหมักที่ใช้ปริมาณแอลกอฮอล์เริ่มต้นต่างกัน

เชื้อจุลินทรีย์	ตัวอย่าง	%แอลกอฮอล์ที่เหลือ	ร้อยละการเปลี่ยนรูป			
			เริ่มต้น	7 วัน	14 วัน	21 วัน
102	ชุดควบคุม	0	7.32	29.04	70.96	32.54
	ไวน์ 3%	0	1.65	39.14	10.10	11.00
	ไวน์ 6%	0	1.27	14.77	36.43	36.94
	ไวน์ 9%	0	0.85	8.34	31.90	35.64
	ไวน์ 12%	0	0.77	5.33	27.37	30.67
	ไวน์ 15%	0	0.62	3.02	16.64	29.19
521	ชุดควบคุม	0	6.77	94.43	37.39	44.43
	ไวน์ 3%	0	1.48	27.56	12.75	11.00
	ไวน์ 6%	0	1.09	41.29	42.60	43.46
	ไวน์ 9%	0	0.85	39.81	42.48	41.45
	ไวน์ 12%	0	0.95	38.57	41.33	39.47
	ไวน์ 15%	0	0.54	35.35	37.12	37.90

จากตารางที่ 1 พบว่า แอลกอฮอล์ที่เหลืออยู่มีค่าเป็นศูนย์หรือไม่สามารถตรวจพบได้ แสดงว่าแอลกอฮอล์ถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดอะซิติกได้หมด ดังนั้น ชุดควบคุมหรือน้ำมะพร้าวที่มีแอลกอฮอล์ 3% สามารถผลิตกรดอะซิติกได้ใกล้เคียงกับทางทฤษฎี หรือมีร้อยละการเปลี่ยนรูปได้สูงถึง 70.96% และ 94.43% เมื่อใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ TISTR 102 และ TISTR 521 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกรดอะซิติกจากการหมักแอลกอฮอล์ที่ได้จากเปลือกกาแฟเชอร์รี่กับน้ำมะพร้าว พบว่า น้ำหมักจากเปลือกกาแฟเชอร์รี่ผลิตกรดอะซิติกได้น้อยกว่าน้ำมะพร้าว เนื่องจากน้ำมะพร้าวมีสารอาหารและฮอร์โมนที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ [27] ขณะที่น้ำหมักจากเปลือกกาแฟมีแอลกอฮอล์และสารประกอบฟีนอลิก แต่ขาดฮอร์โมนและสารอาหารจำเป็น ต้องเติมไนโตรเจนและฟอสฟอรัสเพื่อส่งเสริม

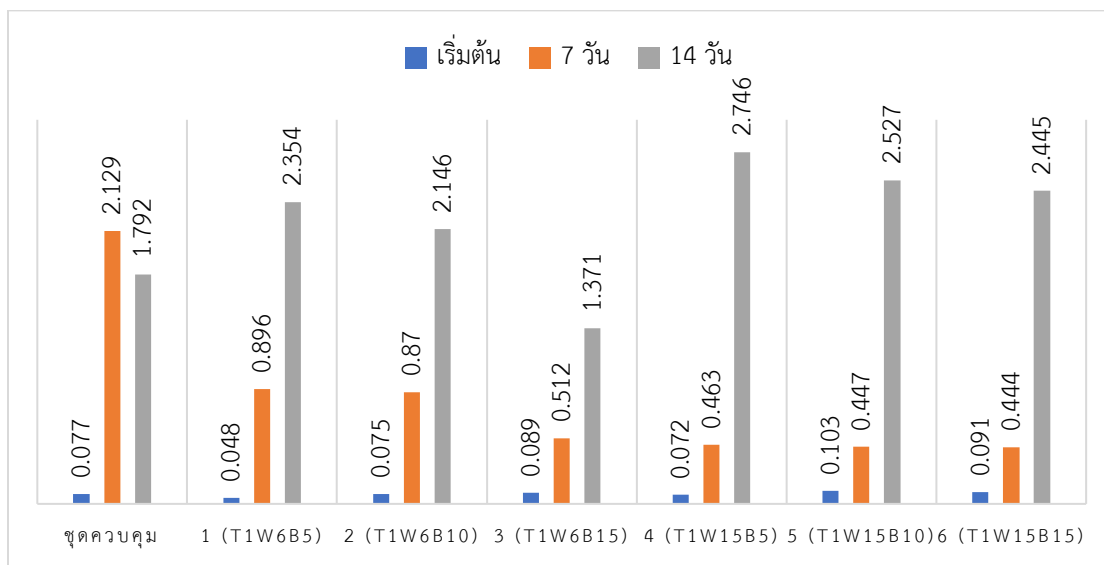
การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์.

กรดอะซิติกที่ผลิตจาก TISTR 102 มีมากกว่า TISTR 521 โดยมีร้อยละการเปลี่ยนรูปที่ 39.14% และ 27.56% ตามลำดับ ที่ระยะเวลาการหมัก 7 วัน และมีแอลกอฮอล์ 3% หลังจากนั้นร้อยละการเปลี่ยนรูปที่ลดลงทั้งสองหัวเชื้อจุลินทรีย์ ทั้งนี้เนื่องจากจุลินทรีย์กลุ่มที่ผลิตกรดอะซิติกเป็นแบคทีเรียที่สามารถออกซิไดซ์เอทานอลเป็นกรดอะซิติกได้ในปริมาณที่มาก และสามารถออกซิไดซ์กรดอะซิติกต่อไปได้จนกลายเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำได้เมื่อมีระยะเวลาในการหมักนานขึ้น [24]

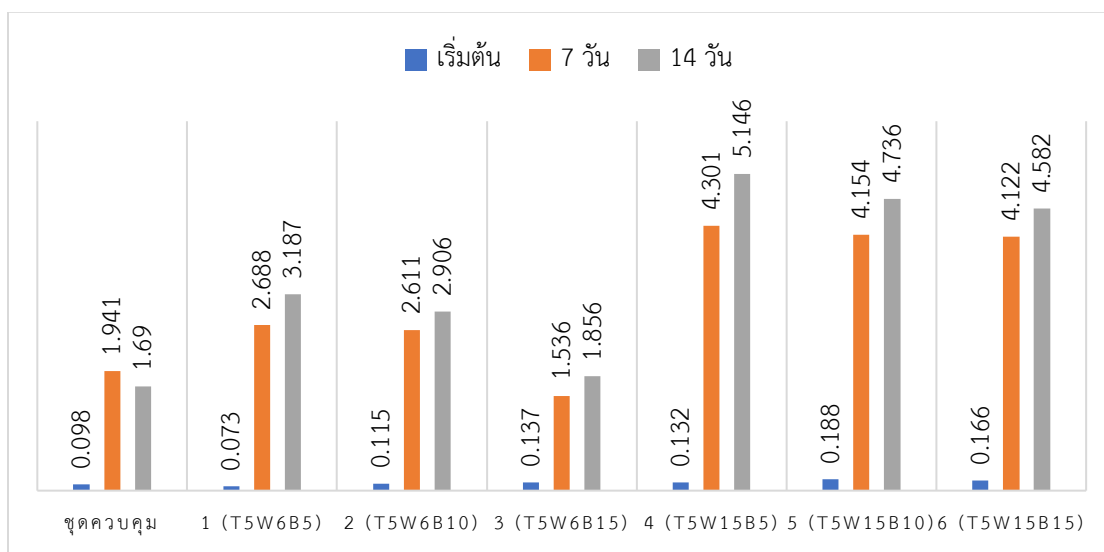
ส่วนน้ำหมักแอลกอฮอล์ที่ 6%, 9%, 12% และ 15% พบว่า หัวเชื้อ TISTR 102 ผลิตกรดอะซิติก และมีร้อยละการเปลี่ยนรูป เป็น 36.94%, 35.64%, 30.67% และ 29.19% ตามลำดับ ส่วนหัวเชื้อ TISTR 521 มีร้อยละการเปลี่ยนรูปเป็น 43.46%, 42.48%, 41.33% และ 37.90% ตามลำดับ ซึ่ง TISTR 521 สามารถผลิตกรดอะซิติกได้มากกว่า TISTR 102 เมื่อปริมาณแอลกอฮอล์เพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ พบว่า กรดอะซิติกและร้อยละการเปลี่ยนรูปมีค่ามากใน 7 วันแรกและมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น แต่เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับระยะเวลาเดียวกัน เนื่องจากระดับความเป็นกรดที่สูงขึ้นส่งผลยับยั้งการทำงานของจุลินทรีย์ [26] ดังนั้นการหมักกรดอะซิติกจึงต้องคำนึงถึงปริมาณแอลกอฮอล์และกรดอะซิติกให้อยู่ในอัตราส่วนที่เหมาะสม เพื่อไม่ให้เกิดอันตรายต่อแบคทีเรียกลุ่ม acetobacter เนื่องจากแอลกอฮอล์และกรดอะซิติกที่มากเกินไปจะยับยั้งการทำงานของจุลินทรีย์ [26] และพบว่าปริมาณแอลกอฮอล์ที่มากขึ้นมีผลทำให้ร้อยละการเปลี่ยนรูปลดลง ทั้งนี้ปริมาณแอลกอฮอล์ที่มากขึ้น ทำให้กรดอะซิติกที่ผลิตได้มีปริมาณสูงขึ้น ซึ่งมีผลทำให้พีเอชของน้ำหมักมีความเป็นกรดมากขึ้น ซึ่งไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ทำให้ประสิทธิภาพการผลิตกรดอะซิติกลดลง [28] และอาจจะส่งผลยับยั้งการทำงานของเชื้อจุลินทรีย์ได้ นอกจากนี้ ระยะเวลาการหมักที่ยาวนาน อาจทำให้กรดอะซิติกเกิดการออกซิไดซ์เป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เนื่องจากการเติมอากาศในกระบวนการหมักทำให้เกิดการออกซิไดซ์ได้อย่างต่อเนื่อง [24].

5.2 ศึกษาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก

จากรูปที่ 4-5 จะเห็นได้ว่า พฤติกรรมของทั้งหัวเชื้อ TISTR 102 และ 521 มีลักษณะที่คล้ายกัน กล่าวคือ ที่ปริมาณหัวเชื้อที่ 5% จะให้กรดอะซิติกมากที่สุดทั้งแอลกอฮอล์ที่ 6% และ 15% และกรดอะซิติกที่ได้มีแนวโน้มลดลงเมื่ออัตราหัวเชื้อเพิ่มมากขึ้น แสดงว่าอัตราส่วนระหว่างอาหารต่อจุลินทรีย์มีน้อยเกินไป ทำให้เมื่อกรดอะซิติกถูกสร้างขึ้นมา สามารถถูกออกซิไดซ์ต่อไปได้ ปริมาณกรดอะซิติกที่ได้จึงมีปริมาณลดลง เมื่อปริมาณหัวเชื้อมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการหมักน้ำส้มสายชูจากเปลือกกาแฟชอร์รี่ ที่มีปริมาณแอลกอฮอล์เริ่มต้นที่ 8% ปริมาณหัวเชื้อที่ 10% สามารถผลิตกรดอะซิติกได้สูงสุดที่ 2.99% [28] นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น ปริมาณกรดอะซิติกที่ได้มีปริมาณเพิ่มมากขึ้นด้วย แสดงว่าจุลินทรีย์ยังสามารถย่อยสลายแอลกอฮอล์ที่มีอยู่ได้อย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะหัวเชื้อ TISTR 102 ที่มีระยะเวลาในการหมักมากกว่า 14 วัน นอกจากนี้ พบว่าในแอลกอฮอล์ 6% ปริมาณหัวเชื้อ 5% และ 10% มีสัดส่วนอาหารต่อจุลินทรีย์ที่เพียงพอต่อการผลิตกรดอะซิติก.



รูปที่ 4 ปริมาณกรดอะซิติกที่ได้จากอัตราหัวเชื้อ TISTR 102 ที่แตกต่างกัน



รูปที่ 5 ปริมาณกรดอะซิติกที่ได้จากอัตราหัวเชื้อ TISTR 521 ที่แตกต่างกัน

เมื่อปริมาณหัวเชื้อ 15% พบว่า กรดอะซิติกจากทั้ง TISTR 102 และ 521 ลดลงอย่างมาก เนื่องจากหัวเชื้อมากเกินไปทำให้แอลกอฮอล์เริ่มต้นไม่เพียงพอ กรดอะซิติกจึงถูกเปลี่ยนเป็นคาร์บอนไดออกไซด์จากการออกซิไดซ์ตลอดเวลา ส่งผลให้กรดอะซิติกลดลงอย่างชัดเจนในระยะเวลาเท่ากัน [24] นอกจากนี้เมื่ออาหารไม่เพียงพอ จุลินทรีย์จะออกซิไดซ์น้ำตาลและเปลี่ยนเป็นกรดอินทรีย์อื่นๆ ทำให้ระดับพีเอชเพิ่มขึ้น ส่งผลให้สภาวะการหมักกรดอะซิติกเปลี่ยนไป และยับยั้งการทำงานของจุลินทรีย์ [26]. สำหรับที่แอลกอฮอล์ 15% พบว่า ที่ปริมาณหัวเชื้อ 5%, 10% และ 15% มีสัดส่วนอาหารต่อจุลินทรีย์ในสัดส่วนที่ยังเพียงพอต่อการผลิตกรดอะซิติก เนื่องจากกรดอะซิติกที่ได้ทั้งหัวเชื้อ TISTR 102 และ 521 มีค่าใกล้เคียงกัน โดยมีค่าลดลงเมื่อปริมาณหัวเชื้อเพิ่มขึ้น ซึ่งมีค่าแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย

ตารางที่ 2 ร้อยละการเปลี่ยนรูป (%conversion) จากการหมักที่ใช้ปริมาณหัวเชื้อจุลินทรีย์ต่างกัน

หัวเชื้อ	ตัวอย่าง	%แอลกอฮอล์ ที่เหลือ	%conversion		
			เริ่มต้น	7 วัน	14 วัน
102	ชุดควบคุม	0	2.65	73.16	61.58
	1 (T1W6B5)	0	0.81	15.21	39.96
	2 (T1W6B10)	0	1.27	14.77	36.43
	3 (T1W6B15)	0	1.52	8.69	23.27
	4 (T1W15B5)	0	0.49	3.15	18.69
	5 (T1W15B10)	0	0.70	3.05	17.20
	6 (T1W15B15)	0	0.62	3.02	16.64
521	ชุดควบคุม	0	3.37	66.70	58.08
	1 (T5W6B5)	0	1.24	45.64	54.11
	2 (T5W6B10)	0	1.95	44.33	49.34
	3 (T5W6B15)	0	2.33	26.08	31.51
	4 (T5W15B5)	0	0.90	29.28	35.03
	5 (T5W15B10)	0	1.28	28.28	32.24
	6 (T5W15B15)	0	1.13	28.06	31.19

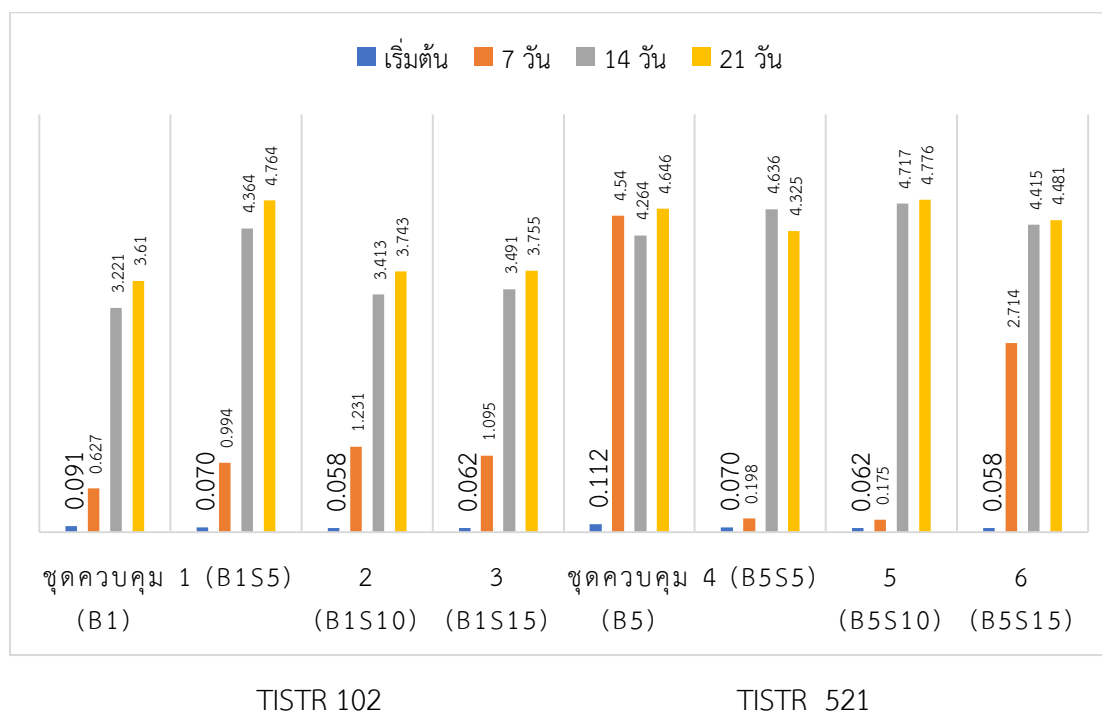
จากตารางที่ 2. พบว่า ร้อยละการเปลี่ยนรูปหรือ %conversion ของหัวเชื้อ TISTR 102 ที่แอลกอฮอล์ที่ 6% ที่ปริมาณหัวเชื้อ 5% และ 10% มีร้อยละการเปลี่ยนรูปใกล้เคียงกันเป็น 15.21% และ 14.77% ตามลำดับ ที่ระยะเวลา 7 วัน และเพิ่มขึ้นเป็น 39.96% และ 36.43% ตามลำดับ ที่ระยะเวลา 14 วัน แต่ที่ปริมาณหัวเชื้อ 15% ร้อยละการเปลี่ยนรูปมีค่าน้อยกว่า ที่ 5% และ 10% เป็นอย่างมาก โดยมีร้อยละการเปลี่ยนรูปที่ระยะเวลา 7 และ 14 วัน เป็น 8.69% และ 23.27% ตามลำดับ ในทำนองเดียวกันหัวเชื้อ TISTR 521 มีพฤติกรรมของร้อยละการเปลี่ยนรูปเช่นเดียวกับหัวเชื้อ TISTR 102 โดยที่แอลกอฮอล์ที่ 6% ที่ปริมาณหัวเชื้อ 5% และ 10% มีร้อยละการเปลี่ยนรูปใกล้เคียงกันเป็น 45.64% และ 44.33% ตามลำดับ ที่ระยะเวลา 7 วัน และเพิ่มขึ้นเป็น 54.11% และ 49.34% ตามลำดับ ที่ระยะเวลา 14 วัน ในทำนองเดียวกันที่ปริมาณหัวเชื้อ 15% มีร้อยละการเปลี่ยนรูปที่เพิ่มขึ้น เมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น เช่นกัน แต่ร้อยละการเปลี่ยนรูปที่ได้มีค่าค่อนข้างน้อย ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณอาหารไม่เพียงพอกับปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำหมัก ซึ่งมีร้อยละการเปลี่ยนรูปเป็น 26.08% และ 31.51% ตามลำดับ ที่ระยะเวลา 7 และ 14 วัน แสดงว่าที่แอลกอฮอล์ 6% ปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตกรดอะซิติกอยู่ที่ 5-10%

สำหรับแอลกอฮอล์ที่ 15% พบว่า ร้อยละการเปลี่ยนรูปมีค่าน้อยกว่า แอลกอฮอล์ที่ 6% ค่อนข้างมาก ทั้งในระยะเวลา 7 และ 14 วัน ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยที่ปริมาณแอลกอฮอล์เพิ่มมากขึ้น ความเข้มข้นของ

กรดอะซิติกที่ได้มีค่าสูงขึ้น แต่ร้อยละการเปลี่ยนรูปมีค่าลดลง เนื่องจากปริมาณแอลกอฮอล์ที่มากเกินไปมีผลต่อการทำงานของจุลินทรีย์ [26]

5.3 ศึกษาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก

จากรูปที่ 6 จะเห็นได้ว่า ปริมาณน้ำตาลที่เหมาะสมสำหรับหัวเชื้อ TISTR 102 อยู่ที่ 5% Brix ทั้งนี้เนื่องจากได้ปริมาณกรดอะซิติกสูงสุดที่ 4.364% และ 4.764% ตามลำดับ ที่ระยะเวลา 7 และ 14 วัน ตามลำดับ และมีค่าลดลงเมื่อปริมาณน้ำตาลเพิ่มขึ้นเป็น 10% และ 15% โดยมีปริมาณกรดอะซิติกที่ได้มีค่าใกล้เคียงทั้งสองระยะเวลา ซึ่งปริมาณกรดอะซิติกที่ได้ที่ปริมาณน้ำตาล 10% ที่ระยะเวลา 7 และ 14 วัน เป็น 3.413% และ 3.743% ตามลำดับ และที่ปริมาณน้ำตาล 15% ที่ระยะเวลา 7 และ 14 วัน เป็น 3.491% และ 3.755% ตามลำดับ



รูปที่ 6 ปริมาณกรดอะซิติกที่ได้จากปริมาณน้ำตาลที่แตกต่างกัน

สำหรับ หัวเชื้อ TISTR 521 พบว่าปริมาณน้ำตาลที่เหมาะสม อยู่ที่ 10% Brix ทั้งนี้เนื่องจากได้ปริมาณกรดอะซิติกสูงสุดที่ 4.717% และ 4.776% ตามลำดับ ที่ระยะเวลา 7 และ 14 วัน และที่ปริมาณน้ำตาล 5% มีปริมาณกรดอะซิติกใกล้เคียงกับที่ปริมาณน้ำตาล 10% ที่ 4.636% และ 4.325% ตามลำดับ ที่ระยะเวลา 7 และ 14 วัน สำหรับที่ปริมาณน้ำตาล 15% มีปริมาณกรดอะซิติกน้อยที่สุด แต่มีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก โดยที่ระยะเวลา 7 และ 14 วัน มีปริมาณกรดอะซิติกที่ 4.415% และ 4.481% ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากน้ำตาลที่มีอยู่ในน้ำหมักสามารถเพิ่มแหล่งคาร์บอนให้กับจุลินทรีย์ในสภาวะที่ขาดสารอาหารได้ [26] ซึ่งเห็นได้ว่ากรดอะซิติกเกิดขึ้นได้จากการเปลี่ยนรูปของแอลกอฮอล์ด้วยหัวเชื้อ acetobacter เท่านั้น แต่น้ำตาลสามารถนำมาใช้เพื่อเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ให้มากขึ้นได้ ซึ่งไม่มีผลต่อปริมาณกรดอะซิติกที่ผลิตได้ ดังนั้นปริมาณน้ำตาลที่เพิ่มขึ้น ไม่มีผลต่อปริมาณกรดอะซิติกที่ผลิตได้อย่างมีนัยสำคัญ เพื่อความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์และการลดต้นทุน จึงเลือกใช้น้ำตาลที่ 5% ในการผลิตกรดอะซิติก

5.4 ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากการผลิตน้ำส้มสายชูหมัก

สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดอะซีติกจากแอลกอฮอล์ที่ได้จากการหมักเปลือกกาแฟเชอร์รี่ ได้เลือกปริมาณแอลกอฮอล์เริ่มต้นที่ 6% หัวเชื้อจุลินทรีย์ TISTR 521 ที่ 5% และปริมาณน้ำตาลที่ 5% เพื่อผลิตกรดอะซีติกที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและสารต้านอนุมูลอิสระในรูปแบบของ DPPH และ FRAP ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 คุณภาพกรดอะซีติกที่ได้จากการหมักแอลกอฮอล์ที่ 6% หัวเชื้อจุลินทรีย์ TISTR 521 โดยมีปริมาณหัวเชื้อที่ 5% และปริมาณน้ำตาลที่ 5%

พารามิเตอร์	หน่วย	ไวน์	น้ำส้มสายชูหมัก
ความเป็นกรด-ด่าง		3.45±0.21	3.29±0.15
ปริมาณฟีนอลิก	mg GAE/g	76.92±0.26	179±40
	ug GAE/ml	440±18	715±158
ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH	ug ascorbic/ml	153±4	21.27±2
	%Inhibition	36.77±0.04	8.36±0.84
ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ FRAP	mg FeSO ₄ /g	21.28±0.22	38.79±3.92
	ug FeSO ₄ /ml	122±3	139±4
ปริมาณกรดอะซีติก	%		4.48±0.34

จากตารางที่ 3 พบว่า ปริมาณฟีนอลิกที่ได้จากไวน์ตั้งต้นมาหมักเป็นน้ำส้มสายชูหมักมีปริมาณที่เพิ่มขึ้นจาก 76.92 เป็น 179 มก.กรดแกลลิกต่อกรัมเปลือกกาแฟ หรือ 440 เป็น 715 มค.ก.กรดแกลลิกต่อมล. ซึ่งสารฟีนอลิกที่ได้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในรูปของ DPPH และ FRAP ปริมาณฟีนอลิกที่เพิ่มขึ้นแล้วอาจจะส่งผลให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นหรือลดลงได้ ขึ้นกับโครงสร้างของสารฟีนอลิกที่มีอยู่ในพืชแต่ละชนิด โดยเฉพาะสารฟีนอลิกที่มีความเป็นขั้วสูงจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้นด้วย [29] แต่ในเปลือกกาแฟพบว่าเมื่อสารฟีนอลิกเพิ่มมากขึ้น มีสารที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น แต่ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระอาจจะไม่เพิ่มขึ้นตามไปด้วย [19]

จากการพิจารณาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในน้ำส้มสายชูที่ได้จากการหมักไวน์เปลือกกาแฟ พบว่า ในไวน์เริ่มต้นมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในรูปของ DPPH มากกว่า FRAP แสดงว่าสารสำคัญจากเปลือกกาแฟเชอร์รี่ หรือสารฟีนอลิกมีกลไกออกฤทธิ์ที่มีประสิทธิภาพในการต้านสารอนุมูลอิสระได้ดี โดยมีกลไกออกฤทธิ์แบบแลกเปลี่ยนไฮโดรเจน (hydrogen) ได้ดีกว่าที่จะออกฤทธิ์เป็นสารต้านออกซิเดชัน หรือให้อิเลคตรอน [20] ทั้งนี้เนื่องจากสารสำคัญที่มีกลไกต้านการออกซิเดชันถูกทำลายไปเนื่องจากอุณหภูมิจากการสกัดที่อุณหภูมิสูง [30] โดยเฉพาะฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในรูปของ DHHP ในไวน์มีค่า 153 มค. ก.กรดแอสคอร์บิกต่อมล. ไวน์ และ 36.77% ตามลำดับ ซึ่งมีค่ามากกว่าในน้ำส้มสายชูหมักอย่างเห็นได้ชัด ที่มีค่า 21.27 มค.ก.กรดแอสคอร์บิกต่อมล. น้ำส้มสายชูหมัก และ 8.36% ตามลำดับ เนื่องจากการเตรียมน้ำไวน์เพื่อนำมาผลิตน้ำส้มสายชู มีการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที ซึ่งอาจมีผล

ทำให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในรูปของ DPPH ลดลงอย่างมาก เพราะความร้อนหรืออุณหภูมิที่สูงขึ้น แต่เมื่อเทียบกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในรูปของ FRAP พบว่า ในน้ำส้มสายชูหมักมีค่า 38.79 มก.สมมูลเฟอรรัสซัลเฟตต่อกรัมเปลือกกาแฟ และ 139 มก.ก.สมมูลเฟอรรัสซัลเฟตต่อมล.น้ำส้มสายชูหมัก ตามลำดับ ซึ่งมีค่ามากกว่าไวน์ ที่ 21.28 มก.สมมูลเฟอรรัสซัลเฟตต่อกรัมเปลือกกาแฟ และ 122 มก.ก.สมมูลเฟอรรัสซัลเฟตต่อมล.น้ำส้มสายชูหมักตามลำดับเพียงเล็กน้อย เนื่องจากในกระบวนการผลิตกรดอะซิติกมีการเติมอากาศและใช้เวลาในการเติมอากาศมากกว่าการผลิตไวน์ ทำให้สามารถกำจัดออกซิเจนที่ขาดออกซิเจนได้มากกว่า และจะเห็นได้ว่าเมื่อแอลกอฮอล์ถูกออกซิไดซ์ไปเป็นกรดอะซิติกมีผลทำให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในรูปของ FRAP สูงกว่า DPPH เนื่องจากกรดอะซิติกที่ได้มีฤทธิ์เป็นสารต้านออกซิเดชันหรือให้อิเลคตรอน ได้ดีกว่ากลไกออกฤทธิ์แบบแลกเปลี่ยนไฮโดรเจน [20]

6. สรุปผล

จากการวิจัยนี้ สามารถสรุปได้ว่าน้ำส้มสายชูหมักสามารถผลิตได้จากแอลกอฮอล์ที่ได้จากการหมักเปลือกกาแฟ เชอร์รี่ หรือไวน์เปลือกกาแฟเชอร์รี่ ซึ่งได้ผลิตภัณฑ์ที่สารประกอบฟีนอลิก ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้งในรูปของ DPPH และ FRAP โดยสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดอะซิติกจากแอลกอฮอล์ที่ได้จากการหมักเปลือกกาแฟเชอร์รี่ที่แอลกอฮอล์ 6% หัวเชื้อจุลินทรีย์ TISTR 521 ที่ 5% และปริมาณน้ำตาลที่ 4.5% ซึ่งสามารถผลิตกรดอะซิติกได้มากกว่า 4% ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีสารประกอบฟีนอลิก 715 มก.ก.กรดแกลลิกต่อมล. และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในรูปแบบ DPPH เท่ากับ 21.27 มก.ก.กรดแอสคอร์บิกต่อมล. น้ำส้มสายชูหมัก ซึ่งแสดงถึงฤทธิ์ยับยั้งที่ 8.36% ขณะเดียวกันในรูปแบบ FRAP พบว่ามีค่า 38.79 มก.สมมูลเฟอรรัสซัลเฟตต่อกรัมเปลือกกาแฟ และ 139 มก.ก.สมมูลเฟอรรัสซัลเฟตต่อมล. น้ำส้มสายชูหมักตามลำดับ ผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในรูปแบบ FRAP มีประสิทธิภาพสูงกว่าฤทธิ์ในรูปแบบ DPPH ซึ่งแสดงถึงศักยภาพในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีคุณค่าทางโภชนาการและสุขภาพในอนาคต เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกที่ได้มีส่วนช่วยในระบบย่อยอาหารและมีสารแอนติออกซิเดนท์ช่วยลดการอักเสบของเซลล์ได้ รวมทั้งยังช่วยลดระดับการเพิ่มขึ้นของน้ำตาลกลูโคส และอินซูลินหลังการรับประทานอาหารได้อีกด้วย

7. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

8. เอกสารอ้างอิง

- [1] ไพโรจน์ วิริยจารี. (2550). การพัฒนากาแฟพันธุ์อาราบิก้าจากผลพลอยได้ของกระบวนการแปรรูปกาแฟระยะที่ 1: การผลิตเมล็ดกาแฟดิบด้วยเทคโนโลยีทางเอนไซม์. ภาควิชาเทคโนโลยีการพัฒนาลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. [รายงานการวิจัย]. Resolve_DOI=10.14457/CMU.res.2016.2

- [2] ชุติมณฑน์ พลอยประดับ, พุทธพร เจียมสุขภักดิ์ และนิรมล ปัญญาบุศยกุล. (2553).ฤทธิ์การต้านออกซิเดชั่นของส่วนต่างๆ ของผลกาแฟอาราบิก้า และเปลือกกาแฟ. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร*. 41(3/1), 577-580.
- [3] Nguyen, T.M.T., Cho, E.J., Oh, T., Song, C.H., Funada, R. and Bae, H.J. (2019). Use of coffee flower as a novel resource for the production of bioactive compounds, melanoidins, and bio-sugars. *Food Chem*, 299, Article ID 125120.
- [4] Hirano, R., Sasamoto, W., Matsumoto, A., Itakura, H., Igarashi, O. and Kondo, K. (2001). Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation. *J Nutr Sci Vitaminol*, 47(5), 357-362.
- [5] Rains, T. M., Agarwal, S. and Maki, K. C. (2011). Antiobesity effects of green tea catechins: a mechanistic review. *J Nutr Biochem*, 22(1), 1-7.
- [6] Kao, Y. H., Chang, H. H., Lee, M. J. and Chen, C. L. (2006). Tea, obesity, and diabetes. *Mol. Nutr. Food Res*, 50(2), 188-210.
- [7] วราวุฒิ ครุสงฆ์ และรุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต. (2532). *เทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม*. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์ กรุงเทพฯ.
- [8] Lipp, M., Radovic, B.S. and Anklam, E. (1998). Characterization of vinegar by pyrolysis-mass spectrometry. *Food Control*, 9(6), 349-355.
- [9] Ye, X.J., Shigeru, E., Morimura, A, Han, L.S., Shigematsu, T. and Kida, K. (2004). In Vitro evaluation of physiological activity of vinegar produced from Barley-, sweet potato-, and rice-shochu post-distillation slurry. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 68(3), 551–556.
- [10] Arnold, S., Becker, T., Delgado, A., Emde, F. and Enenkel, A. (2002). Optimizing high strength acetic acid bioprocess by cognitive methods in an unsteady state cultivation. *J. Biotech*, 97(2), 133-145.
- [11] Horiuchi, J. I., Kanno, T. and Kobayashi, M. (1999). New vinegar production from onions. *J. Biosci. and Bioeng*, 88(1), 107-109.
- [12] Fregapane, G., Fernández, H.R. and Salvador, M. (2003). Continuous production of wine vinegar in bubble column reactors of up to 60-litre capacity. *European Food Research and Technology*, 216, 63–67.
- [13] วราวุฒิ ครุสงฆ์. (2538). *จุลชีววิทยาในกระบวนการแปรรูปอาหาร*. โอ เอส พริ้นติ้งเฮาส์. กรุงเทพมหานคร. 147-150.
- [14] Ory, I., Romero, L. E., and Cantero, D. (2004). Operation in semi-continuous with a closed pilot plant scale acetifier for vinegar production. *J. Food Eng*, 63(1), 39-45.

- [15] Nanba, A., Kimura, K. and Nagai, S. (1985). Vinegar production by *Acetobacter rancens* cells fixed on a hollow fiber module. *J. Ferment Technol*, 63, 175–179.
- [16] Sokollek, S. J., Hertel, C., Hammes, W. P. (1998). Cultivation and preservation of vinegar bacteria. *J Biotechnol* [Google Scholar]
- [17] สมณทา วัฒนสินธุ์. (2545). *จุลชีววิทยาทางอาหาร*. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. กรุงเทพฯ. 454 หน้า.
- [18] พัทธนันท์ นาถพินิจ, อัจฉรา ไชยองค์การ และสิรินทิพย์ ยะกับ. (2566). ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเปลือกกาแฟเขียวพันธุ์อราบิก้า. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี* 11(2), 83-99.
- [19] พัทธนันท์ นาถพินิจ และอัจฉรา ไชยองค์การ (2567). การผลิตไวน์เพื่อสุขภาพที่อุดมด้วยสารต้านอนุมูลอิสระจากเปลือกกาแฟเขียวพันธุ์อราบิก้า. *Rattanakosin journal of science and technology*, 6(2), 29-39.
- [20] สมหมาย ปัตตาลี. (2551), การศึกษาคุณภาพของน้ำหมักชีวภาพที่ผลิตจากผลมะพลอด [วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, สาขาวิทยาศาสตร์ศึกษา มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒประสานมิตร]
- [21] Pekal A., & Pyrzynska K. (2004). Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay. *Food analysis*, 7, 1776-1782.
- [22] Thomas, J.B., (2012). A Comparative study of the Antioxidant activity (DPPH), Total flavonoid, Total Tannin, Total polyphenol levels in plant extracts of the *Annona muricata*, *Ribes nigrum* and *Manilkara zapota*. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 6(9), 490-494.
- [23] Yang, J., Chen, J.F., Zhao, Y.Y. and Mao, L.C. (2010). Effects of drying processes on the antioxidant properties in sweet potatoes. *Agricultural Sciences in China*, 9(10), 1522–1529.
- [24] ชื่นจิต จันทจรูญพงษ์, นัชดา ราชนิยม และณัฏฐ์ พลพันธุ์. 2561. การศึกษากระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากโคจิข้าวเหนียว. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏธนบุรี*, 8(1), 130-140.
- [25] Ory, I., Romero, L. E., and Cantero, D. 2002. Optimum starting-up protocol of a pilot plant scale acetifier for vinegar production. *J. Food Eng*, 52(1), 31-37.
- [26] ประมวล ทราญทอง. 2554. บทบาทของแบคทีเรียกรดอะซิติกในอุตสาหกรรมอาหาร. *วารสารอาหาร*, 41(4), 316-323.
- [27] อำพิน กันธิยะ. 2552. การใช้ประโยชน์จากของเหลือทิ้งจากการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร: น้ำมะพร้าวแก่. *สารปริทรรศน์อุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่*, 1(1), 1-10.
- [28] นฤมล บุญมี, นักรบ นาคประสม, ขนวัฒน์ นิทัศน์วิจิตร, พัฒนา เพื่องฟู, จริยาพร สังข์ภิรมย์, กนกวรรณ ตาลดี และกาญจนา นาคประสม. 2562. การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอะซิติกในระหว่างกระบวนการหมักน้ำส้มสายชูจากเนื้อผลกาแฟ. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์*, 27(6), 1038-1053.

- [29] ชเนศวร นวลไย และเบญจมาศ ไชยลาภ. (2564). ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของส่วนแยกย่อยจากเปลือกลำต้นของกรวยป่า. *วารสารมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ (สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี)*, 13(26), 38-47.
- [30] Hamama, A.A. and Nawar, W.W. (1991). Thermal decomposition of some phenolic antioxidants. *J. Agric. Food Chem*, 39(6), 1063–1069.