การศึกษาเบื้องต้นของการหมักชายูนนาน

สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล [1*] ภาวินี ซื้อเจริญชัย [2] วิรัตน์ วาณิชย์ศรีรัตนา [3]

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

และ กอง เจียชุน [4]

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ยูนนาน สาธารณรัฐประชาชนจีน

บทคัดย่อ

การผลิตชาหมักและผลิตภัณฑ์ประเภทชาหมักในประเทศไทยยังไม่แพร่หลาย กรรมวิธีการผลิตชาเขียวและชากึ่งหมักมักเป็นเทคโนโลยีนำเข้าทั้งสิ้น ยังขาดการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีการหมัก ทำให้ไม่มีการควบคุมสภาวะการผลิตด้วยเทคนิคสมัยใหม่ ทำให้คุณภาพของชาไม่แน่นอน การศึกษาเบื้องต้นนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาแนวทางของการผลิตชาหมักโดยใช้กล้าเชื้อบริสุทธิ์ จากการแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์จากชาหมักยูนนาน พบเชื้อราที่มีศักยภาพ 3 สายพันธุ์ โดยคัดเลือกเชื้อราขาว 2 สายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์อะมัยเลส โปรตีเอส ไลเพส และเพกทิเนส นำมาใช้เป็นกล้าเชื้อในการทดลองหมักชา โดยการแปรผันปัจจัยเบื้องต้นเพียง 2 ปัจจัย คือ อุณหภูมิ (25, 30 และ 37 ˚C) และความชื้นเริ่มต้น (ร้อยละ 30, 40 และ 50) โดยอาศัยวิธีทากุชิออกแบบการทดลองได้ 9 การทดลอง พบว่าสภาวะที่ให้ผลของปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ละลายและของแข็งละลายมากที่สุด ซึ่งใช้เป็นตัวแทนของตัวแปรสำคัญของคุณภาพชาหมัก คือ การหมักชาที่อุณหภูมิ 30 ˚C และมีความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 30 สามารถคำนวณปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ละลายและของแข็งละลายจากสมการทากุชิได้เท่ากับ 0.062 และ 0.38 กรัม/กรัมชาแห้ง ตามลำดับ สอดคล้องเป็นอย่างดีกับผลการทดลองที่ได้ค่าเท่ากับ 0.062 และ 0.38 กรัม/กรัมชาแห้ง ตามลำดับ และเมื่อนำผลิตภัณฑ์ชาหมักทดลองในห้องปฏิบัติการมาทดสอบทางประสาทสัมผัส พบว่าชาหมักทดลองที่ได้เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคในด้านของกลิ่นและสี แต่ยังต้องปรับปรุงด้านรส และความชอบโดยรวม จึงควรมีการศึกษาปัจจัยทางเคมีกายภาพอื่นที่สำคัญที่มีผลต่อการผลิตและคุณภาพของชาหมักที่ได้ ใช้ในการพัฒนาปรับปรุงกรรมวิธีสมัยใหม่ของการผลิตชาหมักที่ได้มาตรฐาน เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ชาหมักที่มีคุณภาพสม่ำเสมอและผู้บริโภคพึงพอใจ

คำสำคัญ : การหมักชา / ชายูนนาน / กล้าเชื้อบริสุทธิ์ / วิธีทากุชิ

---

* *ผู้นิพนธ์ประสานงาน ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ sarote.s@ku.ac.th*

[1] *รองศาสตราจารย์ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร*

[2] *นิสิตปริญญาตรี ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร*

[3] *ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร*

[4] *รองศาสตราจารย์ คณะเทคโนโลยีและวิทยาศาสตร์การอาหาร*

Preliminary Study for Yunnan Tea Fermentation

Sarote Sirisansaneeyakul [1*], Pawinee Suecharoenchai [2], Wirat Vanichsriratana [3],
Kasetsart University, Bangkok 10900
and Gong Jiashun [4]
Yunnan Agricultural University P.R. China

Abstract

A process for tea fermentation and fermented-type tea products are not widely known in Thailand. Technology for producing green tea and semi-fermented tea has been entirely imported and used without applied fermentation technology. Therefore, Thai fermented tea traditionally produced without using modern processing finds inconsistent and low quality. This study on preliminary tea fermentation was an attempt to use starter culture isolated from Puerh tea of Yunnan Province, P.R. China. Among three fungal strains, two white molds were selected after capably producing amylase, protease, lipase and pectinase. Two factors, i.e. temperature (25, 30, 37 ^{o}C) and initial moisture content (30, 40, 50 %) affecting tea fermentation were investigated with 9 experiments designed by Taguchi method. The highest soluble polysaccharides (PS) and total soluble solid (TSS) contents, which are important variables of qualifying fermented tea, were obtained with tea fermented at 30 ^{o}C and 30 % initial moisture content. Both calculated values from Taguchi model are fitting very well with those experimental results of 0.062 g PS/g dry tea and 0.38 g TSS/g dry tea, respectively. Tea extracts from 9 experiments found aroma and color fairy acceptable with 70 test panels by sensory evaluation. However, taste and overall likeness of tea extract need to be further improved, as well as any additional physico-chemical factors affecting tea quality during tea fermentation, to develop a modern tea processing and to meet high approval of tea consumers.

Keywords : Tea Fermentation / Puerh Tea / Starter Culture / Taguchi Method

[*] *Corresponding author, sarote.s@ku.ac.th*

[1] *Associate Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Agro-Industry.*

[2] *Undergraduate student, Department of Biotechnology, Faculty of Agro-Industry.*

[3] *Assistant Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Agro-Industry.*

[4] *Associate Professor, Faculty of Food Science and Technology.*

1. บทนำ

โดยทั่วไปผลิตภัณฑ์ชาแบ่งออกตามกรรมวิธีการผลิตได้ 3 ประเภท คือ ชาที่ไม่ผ่านกรรมวิธีการหมัก ได้แก่ ชาเขียว (green tea) ชากึ่งหมัก ได้แก่ ชาอูหลง (Oolong tea) และชาหมัก ได้แก่ ชาฝรั่ง (black tea) [1] และชายูนนาน หรือชาพูเออร์ (Puerh tea) ซึ่งเป็นชาหมักเฉพาะถิ่นจากมณฑลยูนนาน สาธารณรัฐประชาชนจีน [2]

ชาประกอบด้วยสารพอลิฟีนอล (polyphenol) มากถึง 20-35 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีผลต่อรสฝาดและสีของน้ำชา สารพอลิฟีนอลที่พบส่วนใหญ่ คือ แทนนิน และแทนนินที่พบในใบชาสดส่วนใหญ่อยู่ในรูปของ catechin ที่มีประโยชน์ทางการแพทย์ ช่วยป้องกันโรคหัวใจ และยับยั้งการก่อตัวของเซลล์มะเร็ง [3] แต่เมื่อชาผ่านกระบวนการหมักจะเกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมี [4] ของใบชาส่งผลต่อ สี กลิ่น และรสชาติของน้ำชา โดยชาหมักมีสารที่มีกลิ่นหอมรวม (aroma complex) อยู่ประมาณ 650 ชนิด ต่างจากในชาเขียวที่มีอยู่ประมาณ 250 ชนิด [5] ซึ่งปฏิกิริยาหลักที่เกิดขึ้นระหว่างขั้นตอนของการหมักชา คือ ออกซิเดชันของ catechin ได้เป็น theaflavin ซึ่งมีสีแดงเข้ม ละลายน้ำได้ดี กับ thearubigin ซึ่งมีสีน้ำตาลเข้ม ละลายน้ำได้น้อย [1] ดังนั้นชาหมักจึงมีสีเข้มกว่าชาที่ไม่ได้ผ่านการหมัก แต่ทั้งนี้ theaflavin ในชาหมัก ก็ยังคงมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระเช่นเดียวกับ catechin ในชาเขียว [6] และการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของใบชาในกระบวนการหมักชานั้นส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ผสม ซึ่งจุลินทรีย์ที่มีตรวจพบในระหว่างการหมักชาและผลิตภัณฑ์ชาหมักตำรับยูนนาน ได้แก่ *Aspergillus niger, Aspergillus gloucus, Aspergillus terreus, Aspergillus candidus, Penicllium, Rhizopus, Cladosprium Saccharomyces* และแบคทีเรีย แต่เชื้อราและยีสต์เท่านั้นมีบทบาทเชิงบวกต่อคุณภาพการหมักชา โดยเชื้อรา *Aspergillus niger* เป็นจุลินทรีย์ที่พบมากที่สุดประมาณ 80% [7-9]

ในการศึกษาการทดลองหมักชาเบื้องต้นได้ออกแบบการทดลองโดยอาศัยวิธีทากุชิ [10] ซึ่งเป็นวิธีการออกแบบทางสถิติที่มีประสิทธิภาพที่สามารถช่วยลดจำนวนชุดการทดลอง ทำให้ประหยัดค่าใช้จ่ายและเวลาในการทดลองและช่วยในการวิเคราะห์ข้อมูลอย่างง่าย [11] โดยอาศัยตาราง orthogonal array ซึ่งแสดงจำนวนการทดลองทั้งหมดที่เป็นไปได้ของปัจจัยและระดับของปัจจัย [10] ปัจจุบันมีการนำวิธีทากุชิมาประยุกต์ใช้ในการพัฒนากรรมวิธีการหมักอย่างกว้างขวาง อาทิ การผลิตกรดแลกติกในอาหารเหลว [12] และอาหารแข็ง [13] และการผลิต monacolin K จากเชื้อรา *Monascus* spp. [14] เป็นต้น

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อการศึกษาเบื้องต้นของใช้กล้าเชื้อราบริสุทธิ์ที่แยกและคัดเลือกได้จากชาหมักยูนนาน นำมาทดลองหมักชาระดับห้องปฏิบัติการ ภายใต้สภาวะการแปรผันของปัจจัยความชื้นและอุณหภูมิ ซึ่งอาศัยเทคนิคการออกแบบการทดลองโดยวิธีทากุชิ มีการวิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ละลายและของแข็งละลายทั้งหมด ซึ่งเป็นตัวแทนของตัวแปรสำคัญที่เกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ชาหมักทดลองที่ได้ทดสอบทางประสาทสัมผัสของผู้บริโภค เพื่อใช้เป็นข้อมูลและแนวทางในการพัฒนาการวิจัยเกี่ยวกับชาหมักตำรับยูนนานหรือผลิตภัณฑ์ชาหมักทางเลือกที่มีผลดีต่อสุขภาพให้เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคในประเทศไทย และการส่งออกชาหมักยูนนานที่มีปริมาณการบริโภคเพิ่มขึ้นในประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีนและเอเชียอาคเนย์ โดยใช้วัตถุดิบใบชาทั้งชนิดและปริมาณผลผลิตที่มีอยู่ในจังหวัดเชียงราย ซึ่งปัจจุบันได้กลายเป็นแหล่งเพาะปลูกชาที่สำคัญแห่งหนึ่งของโลก ซึ่งจะเป็นการส่งเสริมความร่วมมือลักษณะบูรณาการของภาคการเกษตรและอุตสาหกรรมแบบยั่งยืนเชิงพาณิชย์ของกลุ่มประเทศในภูมิภาคลุ่มแม่น้ำโขงต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.1 วัตถุดิบ

1) ชาหมักยูนนาน ผลิตจากยอดชาสด สายพันธุ์ *Camellia sinensis* var. assamica (Mast.) เป็นผลิตภัณฑ์ชาหมักจากเมืองคุนมิง มณฑลยูนนาน สาธารณรัประชาชนจีน

2) ใบชาอบแห้ง ผลิตจากยอดชาสด สายพันธุ์ *Camellia sinensis* var. assamica (Mast.) เป็นวัตถุดิบใบชาอบแห้งจากจังหวัดเชียงราย ประเทศไทย ได้รับการอนุเคราะห์วัตถุดิบจากบริษัท สุวิรุฬห์ชาไทย จำกัด

2.2 การแยกและคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์จากชาหมักยูนนาน

2.2.1 การแยกเชื้อจุลินทรีย์จากชาหมักยูนนาน

นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์ชาหมักยูนนาน น้ำหนัก 1 กรัม บดให้ละเอียดในโกร่งที่ฆ่าเชื้อ ผสมกับน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 9 มิลลิลิตร ได้สารละลายตัวอย่างชาหมักยูนนาน จากนั้นทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อเป็นลำดับ ให้มีการเจือจางเท่ากับ 10^{-1}-10^{-6} ปิเปตสารละลายแขวนลอยตัวอย่างที่เจือจาง 0.1 มิลลิลิตร ลงบนผิวหน้าอาหารวุ้นเพาะเลี้ยงเชื้อ NA, YPD และ PDA [15] ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ เพื่อใช้แยกและนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรีย ยีสต์ และรา ตามลำดับ ทำ 3 ซ้ำ ในแต่ละการเจือจาง ใช้ spreader เกลี่ย ให้ทั่วทุกจาน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สังเกตโคโลนีที่เจริญบนอาหารทุกวัน และนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น

2.2.2 การผลิตเอนไซม์ของเชื้อจุลินทรีย์จากชาหมักยูนนาน

ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ของเชื้อจุลินทรีย์ที่พบในชาหมักยูนนาน พิจารณาจากกิจกรรมของเอนไซม์อะมัยเลส โปรตีเอส ไลเพส และเพกทิเนส โดยกำหนดให้กิจกรรมของเอนไซม์ หมายถึง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส (clear zone) ที่เกิดจากการย่อยสลายของเอนไซม์บนผิวหน้าอาหารแข็งที่ใช้ทดสอบต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีจุลินทรีย์ โดยการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ด้วยวิธี point inoculation บนผิวหน้าอาหารแข็งที่ใช้ทดสอบเอนไซม์อะมัยเลส (starch agar) โปรตีเอส (casein agar) ไลเพส (Tween 80 agar) [15] และเพกทิเนส (pectin agar) [16] บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน สังเกตบริเวณใสที่เกิดขึ้น ในกรณีของเอนไซม์อะมัยเลสและเพกทิเนส ต้องทำการย้อมสีผิวหน้าอาหารเพื่อดูบริเวณใสโดยใช้สารละลายไอโอดีนสำหรับเอนไซม์อะมัยเลส และสารละลาย hexadecyltrimethylammonium bromide เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10-15 นาที สำหรับเอนไซม์เพกทิเนส จากนั้นทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีและบริเวณใสที่เกิดขึ้น เพื่อคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์และคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงนำมาใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักชาต่อไป

2.3 การหมักชาด้วยกล้าเชื้อราบริสุทธิ์

2.3.1 การหาสภาวะที่เหมาะที่สุดในการหมักชาเบื้องต้น

ออกแบบการทดลองหมักชาโดยใช้วิธีทากุชิ กำหนดปัจจัยสำคัญเบื้องต้น 2 ปัจจัย ปัจจัยละ 3 ระดับ ได้แก่ อุณหภูมิ (25 30 และ 37 ˚C) และความชื้นเริ่มต้น (ร้อยละ 30 40 และ 50) (ตารางที่ 1ก) จากนั้นแปรผันสภาวะของปัจจัยทั้งสองโดยอาศัยตาราง orthogonal array [10] ได้การทดลองทั้งหมด 9 การทดลอง (ตารางที่ 1ข)

ตารางที่ 1 การออกแบบการทดลองหาสภาวะที่เหมาะที่สุดในการหมักชาเบื้องต้นโดยวิธีทากุชิ

(ก) ปัจจัยและระดับของปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการหมักชา

สภาวะการทดลอง	ระดับการทดลอง		
	1	2	3
ก อุณหภูมิการหมัก (องศาเซลเซียส)	25	30	37
ข ความชื้นเริ่มต้น (ร้อยละ)	30	40	50

(ข) สภาวะของการทดลองของการหมักชาแบบ L-9 (3^2) orthogonal array โดยวิธีทากุชิ*

การทดลอง	สภาวะการทดลอง	
	ก	ข
1	1	1
2	1	2
3	1	3
4	2	1
5	2	2
6	2	3
7	3	1
8	3	2
9	3	3

* อาศัยโปรแกรมสำเร็จรูป Qualitek 4 (Version 4.82.0) [10]

2.3.2 การหมักชาด้วยถาดพลาสติก

ฆ่าเชื้อวัตถุดิบใบชาอบแห้งและถาดพลาสติกด้วยรังสีอัลตร้าไวโอเลต 1 ชั่วโมง ชั่งใบชาอบแห้งฆ่าเชื้อน้ำหนัก 15.0 กรัม ใส่ลงในถาดพลาสติกฆ่าเชื้อขนาด 10.5x10.5X2.5 เซนติเมตร เตรียมกล้าเชื้อราขาวบริสุทธิ์ 2 สายพันธุ์ โดยการเพาะเชื้อราบนอาหารวุ้นเอียง PDA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน จนกระทั่งเชื้อราเจริญเต็มบนผิวหน้าอาหารเอียง ทำสารแขวนลอยสปอร์ 2 ชนิด ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ นับจำนวนสปอร์ของสารแขวนลอยสปอร์ ด้วย counting chamber เติมสารแขวนลอยสปอร์เชื้อราทั้งสองชนิดลงในถาดที่มีชาอยู่ด้วยอัตราส่วนเท่ากัน (1:1) กำหนดให้ใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 10^7 สปอร์ต่อน้ำหนักใบชาอบแห้ง 15.0 กรัม ปรับความชื้นเริ่มต้นของใบชาในถาดเท่ากับร้อยละ 30, 40 และ 50 ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ คลุมถาดด้วยผ้าขาวบาง บ่มชาที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 37 องศาเซลเซียส โดยการหมักชาทดลองแต่ละสภาวะ 2 ซ้ำ เก็บตัวอย่างชาหมักทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 3 สัปดาห์ เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณความชื้น พอลิแซ็กคาไรด์ละลาย และของแข็งละลาย

2.4 การวิเคราะห์

ปริมาณความชื้น ชั่งตัวอย่างชาหมักบดละเอียด 3 กรัม ใส่ลงในภาชนะ moisture can อบแห้งที่ตู้อบอุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักภาชนะและชาที่ผ่านการอบแห้ง คำนวณร้อยละความชื้นดังสมการที่ 1

$$\text{ร้อยละความชื้น} = \frac{\text{น้ำหนักชาเริ่มต้น (กรัม)} - \text{น้ำหนักชาแห้ง (กรัม)} \times 100}{\text{น้ำหนักชาเริ่มต้น (กรัม)}} \quad \textbf{(1)}$$

ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ละลาย วิเคราะห์ด้วยวิธีฟีนอลซัลฟูริกตามวิธีของ Dubois และคณะ [17] โดยใช้กลูโคสเป็นสารละลายมาตรฐาน เตรียมตัวอย่างน้ำชาโดยชั่งตัวอย่างชาหมัก 3 กรัม เติมน้ำร้อนอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที

ปริมาณของแข็งละลายทั้งหมด (TSS) วิเคราะห์โดยปิเปตตัวอย่างน้ำชาปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในภาชนะ moisture can นำเข้าอบที่ตู้อบอุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักภาชนะหลังผ่านการอบแห้งแล้ว คำนวณปริมาณของแข็งละลายทั้งหมดจากสมการที่ 2

$$\textbf{TSS (กรัมต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักภาชนะและTSS (กรัม)} - \text{น้ำหนักภาชนะ (กรัม)}}{\text{ปริมาตรตัวอย่าง (มิลลิลิตร)}} \quad \textbf{(2)}$$

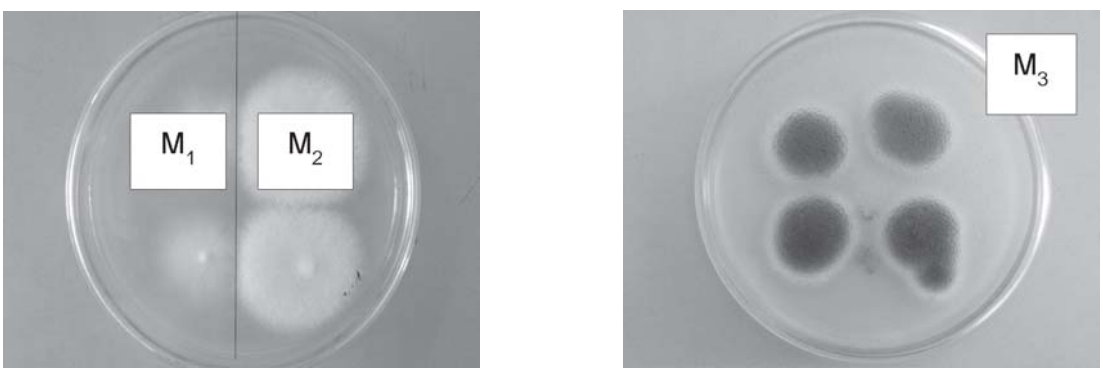
2.5 การทดสอบทางประสาทสัมผัสของชาหมักทดลอง

ชั่งน้ำหนักชาหมักทดลองอายุ 3 สัปดาห์ 3 กรัม เติมน้ำร้อนอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที จากนั้นแยกกากชาออกจากน้ำชา ทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยการชิมโดยวิธี Hedonic scale scoring test [18] ซึ่งเป็นการทดสอบความชอบโดยผู้ทดสอบชิมให้ความพอใจในรูปของคะแนนระดับของความชอบและไม่ชอบผลิตภัณฑ์จากสเกลที่กำหนด ใช้ผู้ทดสอบชิมที่ไม่ผ่านการฝึกฝนทั้งหมดจำนวน 70 คน กำหนดสเกลความชอบดังนี้ 1 = ไม่ชอบมากพิเศษ 2 = ไม่ชอบมาก 3 = ไม่ชอบปานกลาง 4 = ไม่ชอบเล็กน้อย 5 = เฉยๆ 6 = ชอบเล็กน้อย 7 = ชอบปานกลาง 8 = ชอบมาก และ 9 = ชอบมากพิเศษ จากนั้นนำผลที่ได้มาทำการวิเคราะห์การยอมรับของผู้บริโภค ด้วยโปรแกรมทางสถิติ SPSS (SPSS Inc., USA) อาศัยวิธีทดสอบของ Duncan [18]

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

3.1 การแยกและคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์จากชายูนนาน

จากการแยกเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ชาหมักยูนนาน พบเชื้อจุลินทรีย์สำคัญ 2 ชนิด คือ แบคทีเรีย 10^4-10^5 CFU/กรัมชาหมัก และรา 10^5 CFU/กรัมชาหมัก โดยมีจำนวนจุลินทรีย์เจริญใกล้เคียงกันในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA, YPD และ PDA คัดเลือกแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ คือ (1) B_1 โคโลนีสีเหลือง รูปร่างกลม ผิวหน้าเรียบ มันวาว และ (2) B_2 โคโลนีสีเหลือง มีรูปร่างไม่แน่นอนเป็นหยักโค้ง ผิวหน้าขรุขระและด้าน ส่วนราที่คัดเลือกได้มี 3 สายพันธุ์ (รูปที่ 1) คือ (1) M_1 เส้นใยสีขาวเกาะเรียบกับพื้นผิวอาหาร (2) M_2 เส้นใยมีสีขาวฟูขึ้นเป็นกระจุก และ (3) M_3 เส้นใยมีสีดำ เนื่องจากราดำมีอิทธิพลต่อสีของผลิตภัณฑ์ชาหมักอาจทำให้ชาไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค จึงไม่นำมาใช้เป็นกล้าเชื้อบริสุทธิ์ในการหมักชา



(ก) (ข)

รูปที่ 1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราบนอาหารวุ้น PDA ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์ชาหมักยูนนานเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 4 วัน (ก) ราขาว (ข) ราดำ

จากการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์อะมัยเลส โปรตีเอส ไลเพส และเพกทิเนส พบว่าเชื้อรา M_1 และ M_2 ผลิตเอนไซม์ได้ทั้ง 4 ชนิด ส่วนแบคทีเรีย B_1 ผลิตได้เฉพาะเอนไซม์โปรตีเอส และแบคทีเรีย B_2 ไม่ผลิตเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด จึงคาดว่าเชื้อรามีบทบาทสำคัญต่อการหมักชาและคุณภาพของชาหมักมากกว่าแบคทีเรีย ดังรายงานวิจัยที่สรุปไว้ว่าเชื้อราเป็นจุลินทรีย์หลักในกระบวนการหมักชายูนนาน [9] จึงเลือกใช้เฉพาะราขาว M_1 และ M_2 ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์เอนไซม์อะมัยเลส โปรตีเอส ไลเพส และเพกทิเนสได้ ใช้เตรียมเป็นกล้าเชื้อผสมในการหมักชา จากการตรวจวิเคราะห์จำแนกชนิดเชื้อราที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ราดำ M_3 เป็นเชื้อรา *Aspergillus niger* TISTR 3604 ส่วนราขาว M_1 และ M_2 ไม่สามารถจำแนกชนิดได้เนื่องจากไม่สร้างสปอร์ (conidia spore) แต่เส้นใยมีผนังกั้น (hyphae septate) จึงกำหนดไว้เพียงราขาว (white mold) ซึ่งได้ส่งตรวจวิเคราะห์จำแนกชนิดสายพันธุ์เชื้อราขาวทั้งสองอีกครั้งที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ พบว่าเชื้อราทั้งสองชนิดสามารถจำแนกได้เป็นเพียงเชื้อราที่อยู่ในกลุ่ม Mycelia sterilia คลาส Deuteromycetes และไฟลัม Ascomycota

3.2 การเปลี่ยนแปลงของชาหมักระหว่างการหมัก 3 สัปดาห์

3.2.1 ความชื้น

ปริมาณความชื้นของชาหมักภายใต้การทดลองทั้ง 9 สภาวะ ลดลงตามระยะเวลาการหมักที่เพิ่มขึ้น จากปริมาณความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 30-50 ลดลงเหลือเพียงร้อยละ 4-8 หลังจากการหมัก 3 สัปดาห์ (ตารางที่ 2) เนื่องจากกิจกรรมการเจริญของเชื้อราทำให้อุณหภูมิสูงขึ้น จึงเกิดการระเหยของน้ำ สอดคล้องกับปริมาณของเชื้อราที่เพิ่มขึ้น

ตารางที่ 2 การเปลี่ยนแปลงของความชื้นและปริมาณเชื้อราระหว่างการหมักชา

การทดลอง	ปริมาณความชื้นของชาหมัก (ร้อยละ)				ปริมาณเชื้อรา (CFU/กรัมชาแห้ง*)	
	0 สัปดาห์	1 สัปดาห์	2 สัปดาห์	3 สัปดาห์	เริ่มต้น	3 สัปดาห์
1	29.11	7.13	10.73	7.63	$9.3x10^7$	$1.9x10^9$
2	39.42	7.48	11.06	7.25	$8.4x10^7$	$1.9x10^9$
3	49.57	8.16	11.08	7.11	$1.2x10^8$	$1.4x10^9$
4	29.38	7.41	8.30	6.40	$7.1x10^7$	$2.7x10^{10}$
5	39.47	7.34	7.86	6.19	$1.1x10^8$	$2.3x10^{10}$
6	49.41	7.48	7.67	6.09	$7.9x10^7$	$2.4x10^{10}$
7	29.76	4.16	6.60	4.04	$1.3x10^8$	$1.4x10^{10}$
8	40.35	4.46	6.33	4.78	$9.6x10^7$	$1.6x10^{10}$
9	49.99	4.17	6.35	5.03	$1.3x10^8$	$1.7x10^{10}$

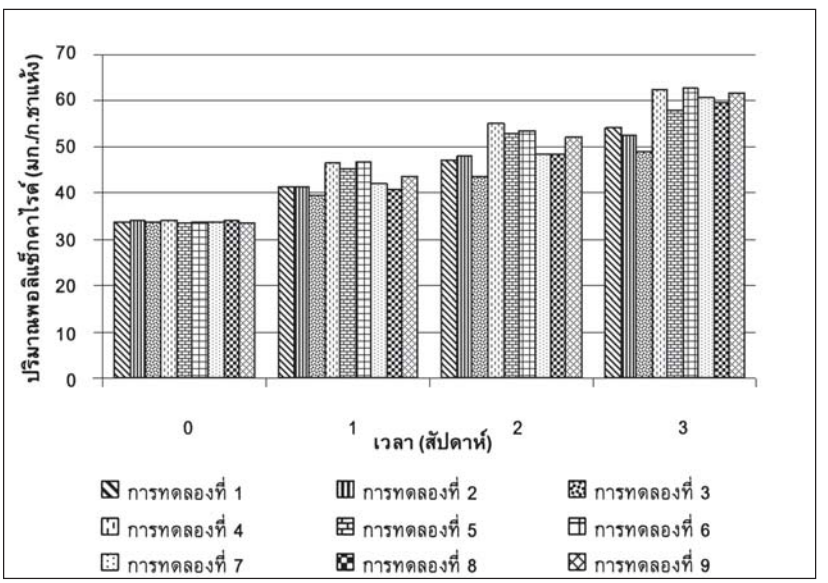
* น้ำหนักชาหมักหักค่าความชื้นออก

3.2.2 เชื้อรา

เชื้อราเจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง 30 และ 37 องศาเซลเซียส มากกว่าอุณหภูมิต่ำ 25 องศาเซลเซียส ดังจะเห็นได้จากการหมักชาภายใต้สภาวะการทดลองที่ 4-9 มีจำนวนเชื้อราเท่ากับ 10^{10} CFU/กรัมชาแห้ง ในขณะที่การหมักชาภายใต้สภาวะการทดลองที่ 1-3 มีจำนวนเชื้อราเท่ากับ 10^{9} CFU/กรัมชาแห้ง หลังจากการหมัก 3 สัปดาห์ (ตารางที่ 2) กิจกรรมการเจริญของเชื้อราย่อมผูกพันกับกิจกรรมของเอนไซม์ของเชื้อราที่จะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและกายภาพของชาหมัก ซึ่งย่อมหมายถึงคุณภาพของชาหมักที่เกิดจากปฏิกิริยาเอนไซม์จากการเจริญของจุลินทรีย์ จึงควรเลือกสภาวะการหมักที่สนับสนุนการเจริญของเชื้อราที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะทางกายภาพและทางเคมีที่ดีของชา อาทิ ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ละลายและของแข็งละลายทั้งหมด เป็นต้น ที่สามารถใช้เป็นดัชนีวัดเบื้องต้นของการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของใบชาระหว่างการหมักได้ ดังรายงานวิจัยพบว่า ปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์ละลายซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญที่แสดงถึงคุณภาพของชาหมักเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในระหว่างการหมักชาตำรับยูนนาน [4] ฉะนั้นการเปลี่ยนแปลงของปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ละลายและของแข็งละลายทั้งหมด จึงสามารถใช้บ่งชี้ถึงการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของใบชาจากการหมักด้วยจุลินทรีย์

3.2.3 พอลิแซ็กคาไรด์ละลาย

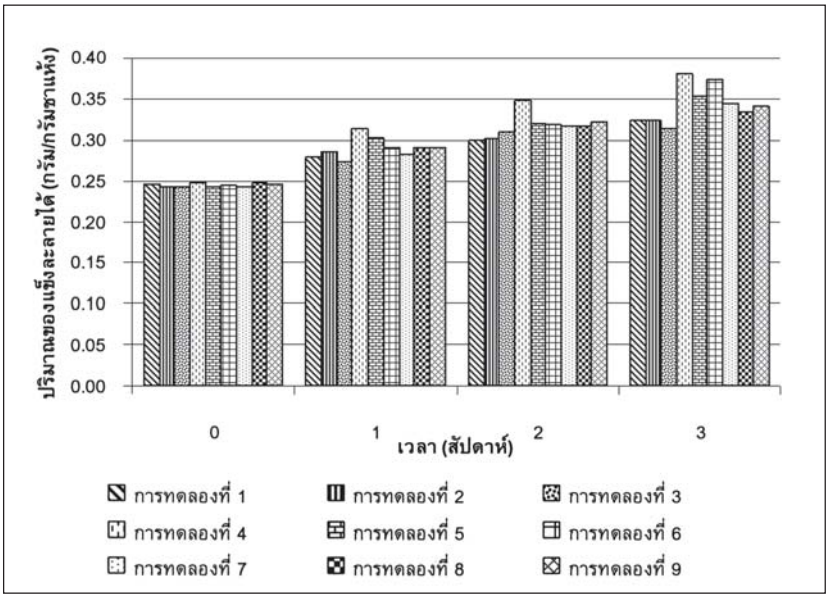
ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ละลายเริ่มต้นของชาทุกสภาวะการหมักใกล้เคียงกัน คือ 33-34 มิลลิกรัม/กรัมชาแห้ง แต่ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ละลายเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการหมัก (รูปที่ 2) หลังจากการหมักชา 3 สัปดาห์ ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ละลายสูงสุดเท่ากับ 62.41 และ 62.63 มิลลิกรัม/กรัมชาแห้ง ภายใต้การหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 30 (การทดลองที่ 4) และร้อยละ 50 (การทดลองที่ 6) ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม จะเห็นว่าปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ละลายขึ้นอยู่กับปริมาณเชื้อรา พบว่าภายใต้สภาวะการหมักที่อุณหภูมิสูง 30 และ 37 องศาเซลเซียส (การทดลองที่ 4-9) ซึ่งเชื้อราเจริญได้ดีกว่าที่อุณหภูมิต่ำ 25 องศาเซลเซียส (การทดลองที่ 1-3) มีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ละลายสูงกว่า เพราะฉะนั้นสภาวะการหมักชาที่อุณหภูมิ 30 หรือ 37 องศาเซลเซียส จึงเหมาะต่อการเจริญของเชื้อราขาวที่เป็นกล้าเชื้อบริสุทธิ์และการเพิ่มปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์ละลายของชาหมักได้



รูปที่ 2 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ละลายของชาระหว่างการหมัก 3 สัปดาห์

3.2.4 ของแข็งละลายทั้งหมด

ปริมาณของแข็งละลายทั้งหมดเพิ่มขึ้นตามการเจริญเพิ่มขึ้นของเชื้อราระหว่างการหมัก (รูปที่ 3) ในลักษณะทำนองเดียวกับผลของปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ละลาย ปริมาณของแข็งละลายทั้งหมดสูงสุดเท่ากับร้อยละ 0.38 ภายหลังการหมักชา 3 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 30 และ 50 ของการทดลองที่ 4 และ 6 ตามลำดับ ซึ่งเชื้อราขาวเจริญได้ดีกว่าอุณหภูมิต่ำ 25 องศาเซลเซียส คาดว่ากิจกรรมการเจริญของเชื้อราย่อมเร่งปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารพอลิฟีนอลในใบชา ปริมาณของแข็งละลายของสารสกัดชาเกิดจากสารเคมีของชาที่อยู่ในรูปของรีดิวซ์ อาทิ การเปลี่ยนแปลงของสาร catechin ไปเป็น theaflavin ซึ่งมีคุณสมบัติละลายน้ำได้ดีกว่า [1] เป็นต้น เพราะฉะนั้นจึงพอสรุปสภาวะการหมักชาเบื้องต้นได้ว่า การหมักชาภายใต้สภาวะของการหมักที่ส่งเสริมการเจริญของเชื้อราที่อุณหภูมิ 30 หรือ 37 องศาเซลเซียส และปริมาณความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 30-50 ดีกว่าการหมักชาที่อุณหภูมิต่ำ 25 องศาเซลเซียส ซึ่งเหมาะสมต่อการหมักชาในประเทศไทยที่มีอากาศร้อนชื้น



รูปที่ 3 การเปลี่ยนแปลงปริมาณของแข็งละลายของชาระหว่างการหมัก 3 สัปดาห์

3.3 การวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธีทากุชิ

การหาสภาวะที่เหมาะที่สุดของการหมักชาด้วยการวิเคราะห์ทางสถิติตามวิธีทากุชิ อาศัยเกณฑ์ของการวัดลักษณะคุณภาพแบบค่าสูงสุด (The bigger is better) [10] เนื่องจากการหมักชามีวัตถุประสงค์เพื่อให้ได้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ละลายและปริมาณของแข็งละลายสูงสุดภายใต้สภาวะของการหมักที่เหมาะสม

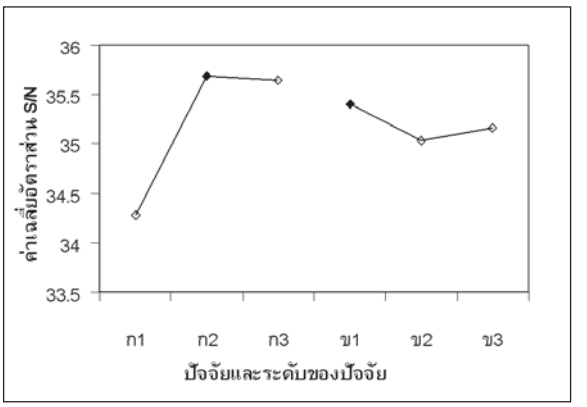
3.4 การหาสภาวะที่เหมาะที่สุดของการหมักชา

สภาวะที่เหมาะที่สุดของการหมักจะพิจารณาจากค่าเฉลี่ยอัตราส่วน S/N ของปัจจัยในแต่ละระดับของการทดลอง โดยค่าเฉลี่ยอัตราส่วน S/N เป็นค่าที่ได้พิจารณาปัจจัยรบกวนภายนอกที่ไม่สามารถควบคุมได้ออกไป และระดับที่ให้ค่าเฉลี่ยอัตราส่วน S/N มากที่สุดจะเป็นภาวะที่เหมาะที่สุดของปัจจัยที่ศึกษานั้น สามารถคำนวณค่าเฉลี่ย

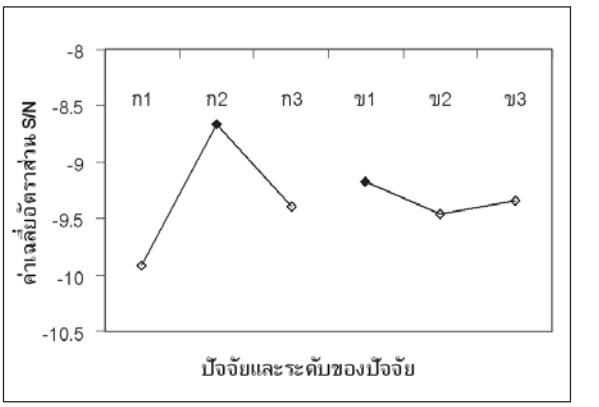
อัตราส่วน S/N ได้จาก ค่าเฉลี่ยอัตราส่วน S/N = -10 Log_{10} (MSD) โดยที่ค่า MSD คำนวณจากสมการ MSD = $(1/Y_1^2 + 1/Y_2^2 + 1/Y_3^2 + \ldots) / N$ เมื่อกำหนดจากการพิจารณาเกณฑ์ค่าสูงสุด [10]

กรณีของการวิเคราะห์ผลของปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ละลายจากการหมักชา (รูปที่ 4ก) สรุปได้ว่าอุณหภูมิของการหมัก (ปัจจัย ก) และปริมาณความชื้นเริ่มต้นของการหมัก (ปัจจัย ข) มีค่าเฉลี่ยอัตราส่วน S/N สูงสุดที่ระดับ 2 และ 1 ตามลำดับ ดังนั้นสภาวะที่เหมาะที่สุดในการหมักชาต่อปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ละลาย คือ การหมักชาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และปริมาณความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 30 ซึ่งสอดคล้องตรงกับสภาวะการทดลองที่ 4

ส่วนการวิเคราะห์ผลของปริมาณของแข็งละลายทั้งหมด (รูปที่ 4ข) ได้ผลสรุปในลักษณะทำนองเดียวกับการวิเคราะห์ผลของปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ละลายจากการหมักชา กล่าวคือ อุณหภูมิของการหมักและปริมาณความชื้นเริ่มต้นของการหมัก มีค่าเฉลี่ยอัตราส่วน S/N สูงสุดที่ระดับ 2 และ 1 ตามลำดับ ดังนั้นจึงสรุปผลรวมได้ว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการหมักชาต่อปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ละลายและของแข็งละลายทั้งหมด คือ การหมักชาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และปริมาณความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 30



(ก) ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ละลาย



(ข) ปริมาณของแข็งละลาย

รูปที่ 4 ค่าเฉลี่ยอัตราส่วน S/N* ของปัจจัยในแต่ละระดับที่มีอิทธิพลต่อการหมักชา
(ก) ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ละลาย (ข) ปริมาณของแข็งละลาย
* วิธีการคำนวณอ้างอิงจาก Sirisansaneeyakul และคณะ [12]

3.5 อิทธิพลของปัจจัยต่อการหมักชา

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) โดยอาศัยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS แสดงให้เห็นว่าอิทธิพลของปัจจัยเบื้องต้น ได้แก่ อุณหภูมิและปริมาณความชื้นเริ่มต้นของการหมักที่มีผลต่อปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ละลายและของแข็งละลายทั้งหมดของชาหมักภายใต้ระยะเวลาของการหมัก 3 สัปดาห์ แสดงดังตารางที่ 3ก และ 3ข ตามลำดับ

ตารางที่ 3 การวิเคราะห์อิทธิพลของปัจจัยที่มีผลต่อการหมักชาโดยวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA)*

(ก) ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ละลาย

Factor	DOF	SS	Variance	F-Ratio	Percent Confidence	Contribution Level	Significant
ก	2	3.871	1.935	13.953	77.353	98.45	p < 0.02
ข	2	0.219	0.109	0.792	0	0	-
Error	4	0.554	0.138		22.647		
Total	8	4.646			100.00		

(ข) ปริมาณของแข็งละลายทั้งหมด

Factor	DOF	SS	Variance	F-Ratio	Percent Confidence	Contribution Level	Significant
ก	2	2.389	1.194	28.506	85.722	99.55	p < 0.01
ข	2	0.132	0.066	1.581	1.811	69.22	p < 0.5
Error	4	0.166	0.041		12.467		
Total	8	2.689			100.00		

* อาศัยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS (SPSS Inc., USA)

ปัจจัยของอุณหภูมิมีผลต่อการหมักชาต่อปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ละลายในชาหมักแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น p < 0.02 แต่ปัจจัยของความชื้นเริ่มต้นไม่มีอิทธิพลการหมักชาต่อปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ละลายในชาหมักอย่างมีนัยสำคัญ (ทดสอบที่ระดับความเชื่อมั่น p < 0.02) อย่างไรก็ตาม ปัจจัยทั้งสองต่างก็มีอิทธิพลต่อการหมักชาต่อปริมาณของแข็งละลายทั้งหมดอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น p < 0.01 และ p < 0.5 ตามลำดับ แต่ปัจจัยของอุณหภูมิการหมักมีอิทธิพลมากกว่าปัจจัยของความชื้นเริ่มต้นของการหมัก

3.6 การประมาณค่าพารามิเตอร์ภายใต้สภาวะการหมักที่เหมาะที่สุด

การวิเคราะห์ผลทางสถิติตามวิธีทากุชิโดยอาศัยค่าเฉลี่ยอัตราส่วน S/N จะได้สภาวะที่เหมาะที่สุดของการหมักชาจากการศึกษาปัจจัยเบื้องต้นของการหมักชาที่มีผลต่อปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ละลายและของแข็งละลายทั้งหมด คือ การหมักชาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (ระดับที่ 2, $ก_2$) และความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 30 (ระดับที่ 1, $ข_1$) ฉะนั้นสามารถคำนวณปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ละลายและของแข็งละลายทั้งหมดได้จากสมการที่ 3

$$Y_{opt} = \overline{T} + (A_2 - \overline{T}) + (B_1 - \overline{T}) \qquad \textbf{(3)}$$

เมื่อ $\overline{T}$ เป็นค่าเฉลี่ยของพารามิเตอร์จากการหมักชา [10] ซึ่งคำนวณค่าได้เท่ากับ 0.062 และ 0.38 กรัม/กรัมชาแห้ง ตามลำดับ (ตารางที่ 4ก และตารางที่ 4ข) สอดคล้องเป็นอย่างดีกับผลการทดลองที่ได้ค่าเท่ากับ 0.062 และ 0.38 กรัมต่อกรัมชาแห้ง ตามลำดับ

ตารางที่ 4 การประมาณปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ละลายในสภาวะการหมักชาที่เหมาะสม

(ก) ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ละลาย

ปัจจัย	Level description	Level	Contribution
ก. อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	30	2	0.49
ข. ความชื้นเริ่มต้น (ร้อยละ)	30	1	0.207
Total contribution from all factors			0.697
Current grand average performance			35.202
Expected result at optimum condition			35.899
Expected performance at optimum condition			62.366

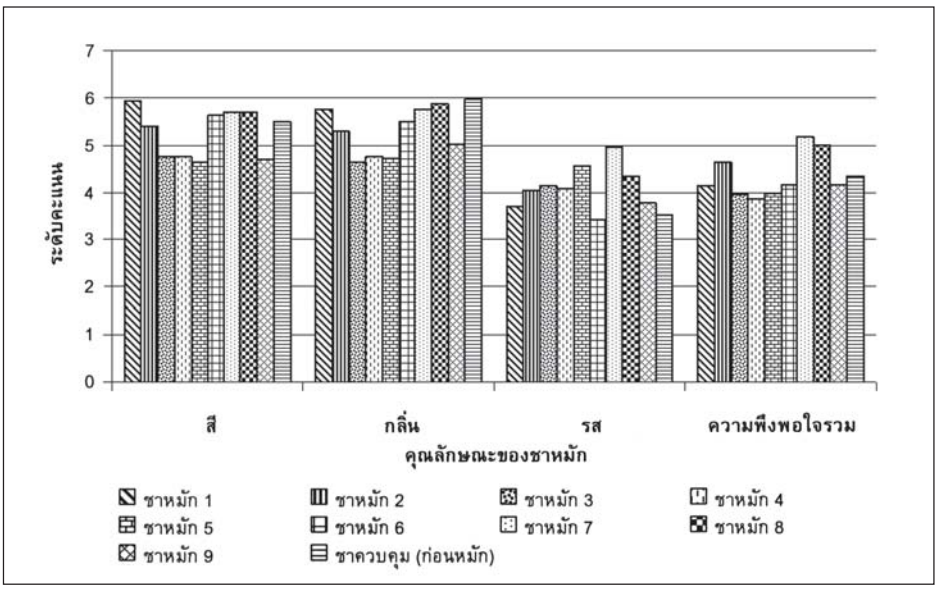
(ข) ปริมาณของแข็งละลายทั้งหมด

ปัจจัย	Level description	Level	Contribution
ก. อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	30	2	0.661
ข. ความชื้นเริ่มต้น (ร้อยละ)	30	1	0.157
Total contribution from all factors			0.819
Current grand average performance			-9.324
Expected result at optimum condition			-8.505
Expected performance at optimum condition			0.376

3.4 การทดสอบทางประสาทสัมผัสของชาหมัก

จากผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสของชาหมักทดลอง 9 ชนิด ที่ผลิตได้มาจากสภาวะการหมัก 9 การทดลอง โดยเปรียบเทียบกับใบชาควบคุม ซึ่งเป็นใบชาอบแห้งที่ใช้เป็นวัตถุดิบเริ่มต้นของการหมักชา (รูปที่ 5) สรุปผลได้ว่า คุณลักษณะด้านสีที่ผู้บริโภคชอบมากที่สุด (5.94) ได้แก่ ชาที่หมักภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 30 (สภาวะการทดลองที่ 1) ส่วนใบชาควบคุมให้ความชอบแก่ผู้บริโภคด้านกลิ่นสูงที่สุดเท่ากับ 5.97 ส่วนชาที่ให้ความชอบแก่ผู้บริโภคด้านรส (4.96) และความชอบโดยรวมสูงที่สุด (5.18) เป็นชาหมักภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 30 (สภาวะการทดลองที่ 7) แสดงว่า ชาหมักทดลองได้รับการยอมรับของผู้บริโภคในคุณลักษณะด้านกลิ่นและสี แต่ต้องปรับปรุงด้านรสและความชอบโดยรวมเพื่อทำให้เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคมากยิ่งขึ้น อย่างไรก็ตาม ชาหมักภายใต้สภาวะที่เหมาะที่สุดจากการวิเคราะห์ผลของวิธีทากุชิ ซึ่งหมักชาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และปริมาณความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 30 (สภาวะการทดลองที่ 4) พบว่าการทดสอบทางประสาทสัมผัสของผู้บริโภคไทยยังไม่ได้รับการยอมรับมากนัก แต่ก็ยังมีระดับคะแนนของคุณลักษณะของชาที่ทดสอบอยู่ระหว่าง 3.70-5.94 ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายังสามารถปรับปรุงให้เป็นที่ยอมรับได้ของผู้บริโภคต่อไป คาดว่าการทดสอบทางประสาทสัมผัสอาจจะมีอิทธิพลจากผู้บริโภคคนไทยที่ไม่คุ้นเคยกับผลิตภัณฑ์ชาหมักด้วยจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นชาหมักตำรับยูนนานเฉพาะถิ่นที่มีประวัติความเป็นมายาวนานของจีนที่ได้รับการยอมรับว่าเป็นชาสุขภาพชั้นเลิศ อย่างไรก็ตาม การทดสอบทาง

ประสาทสัมผัสเป็นผลการทดลองเบื้องต้นที่แสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและกายภาพของใบชาที่ผ่านการหมักด้วยจุลินทรีย์ ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ทางเคมี อาทิ ปริมาณสารประกอบพอลิฟีนอลที่ลดลงจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน จะทำให้รสชาติและกลิ่นของชาหมักกลมกล่อมยิ่งขึ้น และน้ำชาที่ได้จะมีสีเข้มขึ้นจากองค์ประกอบที่เป็นส่วนผสมระหว่าง Theaflavins, Thearubigins และ Theabrown [4] เป็นต้น จึงส่งผลโดยตรงต่อการยอมรับของผู้บริโภคทางประสาทสัมผัสทางด้านสี กลิ่น และรส



รูปที่ 5 ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสของชาหมักทดลอง

4. สรุปผล

จุลินทรีย์สำคัญที่แยกและคัดเลือกได้จากผลิตภัณฑ์ชาหมักยูนนานมีทั้งหมด 5 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อรา 3 สายพันธุ์ และแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ แต่กล้าเชื้อบริสุทธิ์ที่นำมาใช้ในการหมักชา คือ คัดเลือกราขาว 2 สายพันธุ์ ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะมัยเลส โปรตีเอส ไลเพส และเพกทิเนส ซึ่งมีลักษณะรูปร่างทางกล้องจุลทรรศน์ คือ เส้นใยมีผนังกั้นแต่ไม่สร้างสปอร์คอนิเดีย จากการหมักชาทดลองโดยอาศัยการออกแบบด้วยวิธีทากุชิ แปรผันปัจจัยเบื้องต้น 2 ปัจจัย ปัจจัยละ 3 ระดับ ได้แก่ อุณหภูมิ (25, 30 และ 37 องศาเซลเซียส) และความชื้นเริ่มต้น (ร้อยละ 30, 40 และ 50) พบว่า สภาวะการหมักที่ให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ละลายและปริมาณของแข็งละลายสูงสุด คือ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 30 โดยมีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ละลายและปริมาณของแข็งละลายจากการคำนวณโดยวิธีทากุชิเท่ากับ 0.062 และ 0.38 กรัม/กรัมชาแห้ง ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องเป็นอย่างดีกับผลการทดลองที่ได้ จากการทดสอบทางประสาทสัมผัสพบว่าชาหมักทดลองที่ได้เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคในด้านของกลิ่นและสี ที่แสดงถึงผลการเปลี่ยนแปลงทางเคมีกายภาพของใบชาจากการเจริญของกล้าเชื้อราผสม แต่ยังคงต้องปรับปรุงด้านรสและความชอบโดยรวมของชาหมักทดลองที่ดีต่อไป โดยเปรียบเทียบกับคุณภาพของผลิตภัณฑ์ชาหมักยูนนานในท้องตลาด จึงควรมีการศึกษาปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการผลิตชาหมักและคุณภาพของชาหมักที่ได้ ตลอดจนการวิเคราะห์ทางเคมีเชิงปริมาณที่จะสามารถแสดงให้เห็นถึงคุณภาพของชาหมักที่แท้จริงได้ อาทิ สารประกอบพอลิฟีนอลต่างๆ ที่สำคัญในใบชาเริ่มต้นและผลิตภัณฑ์

ชาหมักสุดท้าย เป็นต้น เพื่อเป็นการปรับปรุงกรรมวิธีการผลิตชาหมักให้ได้มาตรฐานและผลิตภัณฑ์ชาหมักคุณภาพสูงที่ผู้บริโภคพึงพอใจ

ปัจจุบันประเทศไทยทางภาคเหนือ อาทิ จังหวัดเชียงราย จัดเป็นแหล่งเพาะปลูกชาที่สำคัญของภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และได้รับการยอมรับแล้วว่าเป็นแหล่งเพาะปลูกชาที่สำคัญแห่งหนึ่งของโลก มีพื้นที่และปริมาณการปลูกชาเพิ่มขึ้นทุกปี จึงมีผลผลิตที่เป็นวัตถุดิบของใบชาเพียงพอต่อการแปรรูปผลิตภัณฑ์ชาได้หลากหลายตำรับเพื่อบริโภคภายในประเทศและส่งออกต่างประเทศ ปัจจุบันประเทศที่มีการผลิตชาเขียวและชาอูหลงเป็นหลัก ยังขาดการผลิตชาหมักที่มีความต้องการของตลาดในประเทศจีนและเอเชียอาคเนย์ที่มีปริมาณการบริโภคสูง ชาจัดเป็นเครื่องดื่มสุขภาพที่ดีชนิดหนึ่ง และจัดเป็นพืชและสินค้าเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยในอนาคตได้ จึงควรสนับสนุนการวิจัยเรื่องชาและการผลิตอย่างยิ่ง โดยเฉพาะยิ่งเทคโนโลยีของการผลิตชาสมัยใหม่และกรรมวิธีการผลิตชาหมักที่ยังคงไม่มีในประเทศไทย งานวิจัยเกี่ยวกับการผลิตชาในประเทศไทยยังมีน้อยมาก งานวิจัยเบื้องต้นนี้จึงถือว่าเป็นการกระตุ้นเพื่อให้นักวิจัยไทยหันมาให้ความสนใจและพัฒนาเกี่ยวกับเทคโนโลยีการผลิตชาในเมืองไทย เพื่อรองรับกับการเติบโตของอุตสาหกรรมการผลิตชาในประเทศที่มีปริมาณการผลิตชาและการส่งออกชาเพิ่มขึ้นทุกปี ดังจะเห็นได้ชัดจากเศรษฐกิจของจังหวัดเชียงรายในปัจจุบันที่ขึ้นอยู่กับชาเป็นหลักทั้งในแง่ของผลิตภัณฑ์ชาและอุตสาหกรรมการท่องเที่ยวเชิงนิเวศของไร่ชาจากแหล่งเพาะปลูกชาของจังหวัด

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณอาจารย์ศลิษา สุวรรณภักดิ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการจัดจำแนกเชื้อราขาว 2 ชนิด งานวิจัยเบื้องต้นนี้ได้รับการสนับสนุนจากโครงการแลกเปลี่ยนบุคลากรกับประเทศอนุภูมิภาคลุ่มแม่น้ำโขง งบประมาณประจำปี 2548 และโครงการความร่วมมือทางวิชาการภายใต้ความร่วมมือทางวิทยาศาสตร์และวิชาการไทย-จีน ประจำปี 2549 และขอขอบคุณบริษัทสุวิรุฬห์ชาไทยจำกัดที่ได้อนุเคราะห์ใบชาอบแห้งเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการทดลอง

6. เอกสารอ้างอิง

1. สัณห์ ละอองศรี, 2535, *ชา,* พิมพ์ครั้งที่ 1, เค.ยู.บุ๊คเซนเตอร์, กรุงเทพฯ, หน้า 75, 113-129.

2. อุษณีย์ ประวัง, 2548, *ชานอกเวลา,* พิมพ์ครั้งที่ 1, บริษัทซีเอ็ดบุ๊ค จำกัด, กรุงเทพฯ.

3. Stoner, D. G., and Mukhtar, H., 1995, "Polyphenols as Cancer Chemopreventive Agents," *Journal of Cellular Biochemistry,* Vol. 22, pp. 169-180.

4. Gong, J.S., Zhou, H.J., Zhang, X.F., Song, S., and An, W.J., 2005, "Changes of Chemical Components in Puerh Tea Produced by Solid State Fermentation of Sundried Green Tea," *Journal of Tea Science,* Vol. 25, No. 3, pp. 126-132.

5. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2544, *ทรัพยากรพืชในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ลำดับที่ 16 : พืชที่ให้สารกระตุ้น,* พิมพ์ครั้งที่ 2, บริษัท ซีเอ็ดยูเคชั่น จำกัด (มหาชน), กรุงเทพฯ, หน้า 65-68.

6. Leung, L.K., Su, Y., Chen, R., Zhang, Z., Haung, Y., and Chen, Z., 2001, "Theaflavins in Black Tea and Catechins in Green Tea Are Equally Effective Antioxidants," *Journal of Nutrition,* Vol. 131, pp. 2248-2251.

7. Rezacova, V. and Kubatova, A., 2005, "Saprobic Microfungi in Tea Based on *Camellia sinensis* and on Other Dried Herbs," *Czech Mycology,* Vol. 57, No. 1-2, pp. 79-89.

8. Chen, Z.D., Liu, Q.J., and Zhou, C.Q., 1985, "The Microorganism and the Puerh Tea Fermentation," *Journal of Tea Science and Technology,* Vol. 4, pp. 4-7.

9. Zhou, H.J., Li, J.H., Zhao, L.F., Hart, J., and Yang, X.J., 2004, "Study on Main Microbes on Quality Formation of Yunnan Puerh Tea during Solid State Fermentation Process," *Journal of Tea*

Science, Vol. 24, No. 3, pp. 212-218.

10. Roy, R.K., 2001, *Design of Experiments Using The Taguchi Approach,* John Wiley & Sons, Inc., New York.

11. Phadke, M. S., 1989, *Quality Engineering using Robust Design,* Prentice Hall, Englewood Cliffs, N.J., pp. 67-68.

12. Sirisansaneeyakul, S., Luangpipat, T., Vanichsriratana, W., Srinophakun, T., Chen, H. H-H., and Chisti, Y., 2007, "Optimization of Lactic Acid Fermentation by Immobilized *Lactococcus lactis* IO-1 Using Taguchi Method," *Journal Industry Microbiology Biotechnology,* Vol. 34, No. 5, pp. 381-391.

13. Nagarjun P.A., Rao, R.S., Rajesham, S., and Rao, L.V., 2005, "Optimization of Lactic Acid Production in SSF by *Lactobacillus amylovorus* NRRL B-4542 Using Taguchi Methodology," *Journal Microbiology,* Vol. 43, pp 38-43.

14. Chung, C.C., Chen H.H., and Hsieh P.C., 2007, "Application of The Taguchi Method to Optimize Monascuss Culture," *Journal of Food Process Engineering,* Vol. 30, pp. 241-254.

15. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2547, *จุลชีววิทยาปฏิบัติการ,* พิมพ์ครั้งที่ 5, บริษัทเจ้าพระยาระบบการพิมพ์ จำกัด, กรุงเทพฯ, หน้า 204-212.

16. ชวนิฏฐ์ สิทธิดิลกรัตน์, 2546, *"การคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์เพกทิเนสและทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ในการแยกเปลือกปอสา,"* วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ, หน้า 19.

17. Dubois, M., Gilles, K.A., Kamilton, J.K., Rebers, P.A., and Smith, F., 1956, "Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances," *Analytical Chemistry,* Vol. 28, pp. 350-356.

18. ไพโรจน์ วิริยจารี, 2535, *การวางแผนและการวิเคราะห์ทางด้านประสาทสัมผัส,* คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่, หน้า 159-164.