อภินันทนาการ

สัญญาเลขที่ R2560B150

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์โครงการ

โครงการ การศึกษาความหลากหลาย การขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว และการผลิตชาเมี่ยง (ภายใต้โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี)

Biodiversity, Micropropagation postharvest technology and tea production of Miang leave Tea (*Camellia sinensis* cv. *assamica*) (Plant genetic conservation project under the royal initiative of Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn)

คณะผู้วิจัย สังกัด

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พีระศักดิ์ ฉายประสาท[1]
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุญส่ง แสงอ่อน[2]
นายพุทธพงษ์ สร้อยเพชรเกษม[1]

[1] ภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร
คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติ และสิ่งแวดล้อม
มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก
[2] ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร
คณะเกษตรศาสตร์ทรัพยากรธรรมชาติ และสิ่งแวดล้อม
มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน 05 มี.ค. 2563
เลขทะเบียน 1031807
เลขเรียกหนังสือ ว SB
S85
.2
พ7995
2560

สนับสนุนโดย

งบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยนเรศวร

ประจำปีงบประมาณ 2560

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบคุณเป็นอย่างสูงสำหรับมหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้ทุนสนับสนุนการทำวิจัยในหัวข้อ การศึกษาความหลากหลาย การขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว และการผลิตชาเมี่ยง (ภายใต้โครงการ อนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี) ด้วยเงินงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2560 (เลขที่สัญญา R2560B150)

(ผศ.ดร.พีระศักดิ์ ฉายประสาท)
หัวหน้าโครงการวิจัย
พฤศจิกายน 2561

บทสรุปผู้บริหาร

1. รายละเอียดเกี่ยวกับโครงการวิจัย / แผนงานวิจัย

1.1 ชื่อแผนงานวิจัย (ภาษาไทย) การศึกษาความหลากหลาย การขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว และการผลิตชาเมี่ยง (ภายใต้โครงการ อนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี)

(ภาษาอังกฤษ) Biodiversity, Micropropagation postharvest technology and tea production of Miang leave Tea (*Camellia sinensis* cv. *assamica*) (Plant genetic conservation project under the royal initiative of Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn)

1.2 ชื่อโครงการวิจัยภายใต้แผนงานวิจัย

โครงการวิจัยย่อยที่ 1 (ภาษาไทย) การศึกษาความหลากหลาย การขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวเมี่ยง

(ภาษาอังกฤษ) Biodiversity, Micropropagation and postharvest technology of Miang (*Camellia sinensis* cv. *assamica*)

โครงการวิจัยย่อยที่ 2 (ภาษาไทย) การวิจัยและพัฒนาการผลิตชาใบเมี่ยงอย่างยั่งยืน

(ภาษาอังกฤษ) Research and development on sustainable Miang tea production.

1.3 ชื่อคณะผู้วิจัย

1) ชื่อ-สกุล	ผศ.ดร.พีระศักดิ์ ฉายประสาท
คุณวุฒิ	Ph.D. (Agricultural Science)
ตำแหน่ง	ผู้ช่วยศาสตราจารย์
ที่ทำงาน	คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร
โทรศัพท์	055-963014 โทรสาร 055-963015

2) ชื่อ-สกุล ผศ.ดร.บุญส่ง แสงอ่อน
คุณวุฒิ Ph.D. (Food Science and Technology)
ตำแหน่ง ผู้ช่วยศาสตราจารย์
ที่ทำงาน คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร
โทรศัพท์ 055-962745, 055-963014 โทรสาร 055-963015

3) ชื่อ-สกุล นายพุทธพงษ์ สร้อยเพชรเกษม
คุณวุฒิ วท.บ. (เกษตรศาสตร์)
ตำแหน่ง นักวิชาการเกษตร
ที่ทำงาน คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร
โทรศัพท์ 055-963014 โทรสาร 055-963015

4) ชื่อ-สกุล นางสาวนันทา เป็งเนตร์
คุณวุฒิ วท.ม. อุตสาหกรรมเกษตร
ตำแหน่ง อาจารย์
ที่ทำงาน ภาควิชาเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุตรดิตถ์ จ.อุตรดิตถ์
โทรศัพท์ 055-817-700 ต่อ 17 และ 08-1475-9656
โทรสาร 055-817-700 ต่อ 16

5) ชื่อ-สกุล นางดรุณี นาคเสวี
คุณวุฒิ วท.ม. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร
ตำแหน่ง อาจารย์
ที่ทำงาน ภาควิชาเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุตรดิตถ์ จ.อุตรดิตถ์
โทรศัพท์ 055-817-700 ต่อ 17 โทรสาร 055-817-700 ต่อ 16

6) ชื่อ-สกุล นายนคร สานิชวรรณ
คุณวุฒิ วท.ม. สาธารณสุขศาสตร์
ตำแหน่ง อาจารย์

ที่ทำงาน ภาควิชาเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์
มหาวิทยาลัยราชภัฏอุตรดิตถ์ จ.อุตรดิตถ์
โทรศัพท์ 055-817-700 ต่อ 17 โทรสาร 055-817-700 ต่อ 16

1.3 งบประมาณและระยะเวลาทำวิจัย

งบประมาณสนับสนุนโดย งบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยนเรศวร ประจำปีงบประมาณ 2560

งบประมาณที่ได้รับ 2,096,000 บาท (สองล้านเก้าหมื่นหกพันบาทถ้วน)

ระยะเวลาทำวิจัย 12 เดือน 1 ตุลาคม พ.ศ.2560 ถึง เดือน 30 กันยายน พ.ศ.2561

2. สรุปโครงการวิจัย

จากการศึกษาสถานการณ์ในปัจจุบันของชาในประเทศไทย พบว่าสายพันธุ์ชาที่ปลูกแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ พันธุ์ชาอัสสัม (*Camellia sinensis* var. *assamica*) และพันธุ์ชาจีน (*Camellia sinensis* var. *sinensis*) กลุ่มพันธ์ชาอัสซัมบางครั้งเรียกว่า ชาพื้นเมือง ชาป่า หรือชาเมี่ยง เป็นชาที่มีใบขนาดใหญ่ เจริญได้ดีตามป่าที่มีร่มไม้กลุ่มพันธุ์ชาจีนที่มีใบขนาดเล็กกว่าชาอัสสัม พบได้หลายสายพันธุ์ ได้แก่ ชาพันธุ์อู่หลงเบอร์ 17 อู่หลงเบอร์ 12 ชิงชิงอู่หลง ถิกวนอิม และสี่ฤดูเป็นต้น ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกชาทั้งสิ้น 118,101 ไร่ คิดเป็นพื้นที่ปลูกชาอัสสัม 84.4% (98,544 ไร่) และชาจีน 16.6% (19,557) ราคาขายใบชาสดและใบชาจีนสดเฉลี่ย 12 และ 50 บาทต่อกิโลกรัม ในปีพ.ศ. 2550 ประเทศไทยผลิตใบชาสดทั้งสิ้น 81,074 ตัน ซึ่งใบชาสด 77% นำมาผลิตเป็นชาแห้ง และ 23% นำไปผลิตเป็นเมี่ยง ในการผลิตชาแห้งใช้ชาอัสสัมคิดเป็น 96% ที่เหลือเป็นชาจีน ส่วนการผลิตเมี่ยงใช้เฉพาะชาอัสสัม

การสำรวจตำแหน่งพื้นที่ลักษณะการเจริญเติบโตของชาเมี่ยง พบว่า พื้นที่และแหล่งเจริญเติบโตที่สำรวจมีอยู่ 2 แหล่ง คือ ตำบลภูฟ้า อำเภอบ่อเกลือ จังหวัดน่าน พิกัด : ละติจูด 19; 54; 36.6100, ลองติจูต 101; 14; 44.979 และตำบลศรีนาป่าน อำเภอเมือง จังหวัดน่าน พิกัด : ละติจูด 19; 54; 36.6100, ลองติจูต 101; 14; 44.9799 ซึ่งทั้ง 2 แหล่งพบว่าอยู่ที่ความสูงระดับ 500 เมตรขึ้นไป

การสำรวจกระบวนการผลิตของการหมักใบชาเมี่ยงพบว่า พื้นที่และแหล่งที่มีการผลิตการหมักใบชาเมี่ยงมีอยู่ 2 แหล่ง คือ เกษตรกรบ้านศรีนาป่าน ตำบลเรือง อำเภอเมือง จังหวัดน่าน และเกษตรกรบ้านป่าแดด ตำบลช่อแฮ อำเภอเมือง จังหวัดแพร่ อิทธิพลของค่า pH ต่ออุณหภูมิและระยะเวลาการนึ่งใบชาเมี่ยงในกระบวนการผลิตชาใบเมี่ยง (เมี่ยงหมัก) ที่ผ่านการนึ่ง 40 นาที และหมักที่ระยะเวลานานขึ้นจะมีค่า pH ที่สูงกว่า 60 และ 80 นาที ส่วน ปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ของกระบวนการผลิตชาใบเมี่ยงเมื่อระยะเวลาหมักนานขึ้นถึง 6 เดือน จะให้ค่าปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ลดลง

การวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วยเทคนิค pour plate ในอาหาร standard plate count วิเคราะห์จำนวน Bile salt resistant LAB ในอาหาร MRS agar ที่เติม oxgall 0.15% ด้วยเทคนิค pour plate วิเคราะห์ราและยีสต์ในอาหาร Rose Bengal agar ด้วยเทคนิค spread plate ตามวิธีของ ISO 7218:2007 ผลการวิเคราะห์ พบว่า จำนวน Total plate count ในช่วง 3 สัปดาห์แรกมีค่าอยู่ระหว่าง Log5 – Log7 ผลิตภัณฑ์เมี่ยงสุดท้ายพร้อมบริโภคมีจำนวนจุลินทรีย์ลดลงเหลือประมาณ Log5 จำนวน Lactic acid bacteria ในช่วง 3 สัปดาห์แรกมีค่าอยู่ระหว่าง Log4 – Log7 ผลิตภัณฑ์เมี่ยงสุดท้ายพร้อมบริโภคมีจำนวนจุลินทรีย์ลดลงเหลือประมาณ Log3 – Log4 จำนวน Bile salt resistant LAB ในช่วง 3 สัปดาห์แรกมีค่าอยู่ระหว่าง Log5 – Log6 ผลิตภัณฑ์เมี่ยงสุดท้ายพร้อมบริโภคมีจำนวนจุลินทรีย์ลดลงเหลือประมาณ Log3 – Log4 จำนวน Yeast and mold ในช่วง 3 สัปดาห์แรกมีค่าอยู่ระหว่าง Log4 – Log7 ผลิตภัณฑ์เมี่ยงสุดท้ายพร้อมบริโภคมีจำนวนจุลินทรีย์ลดลงเหลือประมาณ Log5 – Log

3. บทคัดย่อภาษาไทยและบทคัดย่อภาษาอังกฤษ (Abstract)

บทคัดย่อ

การศึกษาชาเมี่ยงหรือชาอัสสัม (*Camellia sinensis* var. *assamica*) เพื่อสนองโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพพระรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม พิกัดภูมิศาสตร์ของชาเมี่ยง และศึกษาการใช้ประโยชน์จากเมี่ยง โดยวิธีการศึกษาจากการสำรวจและเก็บตัวอย่าง พบว่า ชาพื้นเมืองที่ขึ้นตามป่า ลักษณะเป็นลำต้นเดี่ยว สูงประมาณ 6 - 18 เมตร เป็นไม้ยืนต้นขนาดใหญ่ ผลการสำรวจตำแหน่งพื้นที่ลักษณะการเจริญเติบโตของชาเมี่ยงพบว่า พื้นที่และแหล่งเจริญเติบโตที่สำรวจมีอยู่ 2 แหล่ง คือ ตำบลภูฟ้า อำเภอบ่อเกลือ จังหวัดน่าน พิกัด : ละติจูด 19; 54; 36.6100, ลองติจูด 101; 14; 44.979 และตำบลศรีนาป่าน อำเภอเมือง จังหวัดน่าน พิกัด : ละติจูด 19; 54; 36.6100, ลองติจูด 101; 14; 44.9799 ซึ่งทั้ง 2 แหล่งพบว่าอยู่ที่ความสูงระดับ 500 เมตรขึ้นไป ผลการสำรวจกระบวนการผลิตของการหมักใบชาเมี่ยงพบว่า พื้นที่และแหล่งที่มีการผลิตการหมักใบชาเมี่ยงมีอยู่ 2 แหล่ง คือ เกษตรกรบ้านศรีนาป่าน ตำบลเรือง อำเภอเมือง จังหวัดน่าน และเกษตรกรบ้านป่าแดด ตำบลช่อแฮ อำเภอเมือง จังหวัดแพร่ อิทธิพลของค่า pH ต่ออุณหภูมิและระยะเวลาการนึ่งใบชาเมี่ยงในกระบวนการผลิตชาใบเมี่ยง (เมี่ยงหมัก) ที่ผ่านการนึ่ง 40 นาที และหมักที่ระยะเวลานานขึ้นจะมีค่า pH ที่สูงกว่า 60 และ 80 นาที ส่วน ปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ของกระบวนการผลิตชาใบเมี่ยงเมื่อระยะเวลาหมักนานขึ้นถึง 6 เดือน จะให้ค่าปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ลดลง
คำสำคัญ : ชาเมี่ยง, ความหลากหลายทางชีวภาพ, สำรวจ

Abstract

To study on Miang or Assam Tea (*Camellia sinensis* var. *assamica*) for responding plant Genetic Conservation Project Under the Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn (RSPG). The objective study on genetic biodiversity of physical, geographic coordinates and usefulness of Miang. We study on survey and collected sample found that wild tea have stem an average 6-18 m., large perennial plant. Survey area of Ming were evaluated 2 sources include Tambon Phu Fa, Bo Kluea district, Nan province (Coordinate: latitude 19; 54; 36.6100, longitude 101; 14; 44.9799) and Tambon Sri Na Pan, Muang, Nan province (Coordinate: latitude 19; 54; 36.6100, longitude 101; 14; 44.9799) which 2 sources ware found with above sea level of more 500 m. Survey fermentation product of Miang that both area and source ware found 2 sources include farmer of Ban Sri Napan, Tombon Reuang, Muang district, Nan province and farmer of Ban Pa Daet, Tambon Cho Hae, Muang district, Phrae province. Moreover, pH have affected temperature and period time of fermentation Miang the results showed that Miang was steamed at 40 minutes and long period time have height pH more than steam 60 and 80 minutes and titrate acidity was decreased when was fermented at 6 months.

Keywords: Miang leave tea, biodiversity, survey

การศึกษาความหลากหลาย การขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว และการผลิตชาเมี่ยง (ภายใต้โครงการ อนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี)

พีระศักดิ์ ฉายประสาท[1] บุญส่ง แสงอ่อน[1] พุทธพงษ์ สร้อยเพชรเกษม[1]

[1]คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร

บทคัดย่อ

การศึกษาชาเมี่ยงหรือชาอัสสัม (*Camellia sinensis var. assamica*) เพื่อสนองโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพพระรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม พิกัดภูมิศาสตร์ของชาเมี่ยง และศึกษาการใช้ประโยชน์จากเมี่ยง โดยวิธีการศึกษาจากการสำรวจและเก็บตัวอย่าง พบว่า ชาพื้นเมืองที่ขึ้นตามป่าลักษณะเป็นลำต้นเดี่ยว สูงประมาณ 6 - 18 เมตร เป็นไม้ยืนต้นขนาดใหญ่ ผลการสำรวจตำแหน่งพื้นที่ลักษณะการเจริญเติบโตของชาเมี่ยงพบว่า พื้นที่และแหล่งเจริญเติบโตที่สำรวจมีอยู่ 2 แหล่ง คือ ตำบลภูฟ้า อำเภอบ่อเกลือ จังหวัดน่าน พิกัด : ละติจูต 19; 54; 36.6100, ลองติจูต 101; 14; 44.979 และตำบลศรีนาป่าน อำเภอเมือง จังหวัดน่าน พิกัด : ละติจูต 19; 54; 36.6100, ลองติจูต 101; 14; 44.9799 ซึ่งทั้ง 2 แหล่งพบว่าอยู่ที่ความสูงระดับ 500 เมตรขึ้นไป ผลการสำรวจกระบวนการผลิตของการหมักใบชาเมี่ยง พบว่า พื้นที่และแหล่งที่มีการผลิตการหมักใบชาเมี่ยงมีอยู่ 2 แหล่ง คือ เกษตรกรบ้านศรีนาป่าน ตำบลเรือง อำเภอเมือง จังหวัดน่าน และเกษตรกรบ้านป่าแดด ตำบลช่อแฮ อำเภอเมือง จังหวัดแพร่ อิทธิพลของค่า pH ต่ออุณหภูมิและระยะเวลาการนึ่งใบชาเมี่ยงในกระบวนการผลิตชาใบเมี่ยง (เมี่ยงหมัก) ที่ผ่านการนึ่ง 40 นาที และหมักที่ระยะเวลานานขึ้นจะมีค่า pH ที่สูงกว่า 60 และ 80 นาที ส่วน ปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ของกระบวนการผลิตชาใบเมี่ยงเมื่อระยะเวลาหมักนานขึ้นถึง 6 เดือน จะให้ค่าปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ลดลง

คำสำคัญ : ชาเมี่ยง, ความหลากหลายทางชีวภาพ, สำรวจ

Biodiversity, Micropropagation postharvest technology and tea production of Miang leave Tea (*Camellia sinensis* cv. *assamica*) (Plant conservation project under the royal initiative of Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn)

Peerasak Chaipraasart [1], Boonsong Saeng-on [1], Puttapong Sroypatkasam[1]

[1]Faculty of Agriculture Natural Resources and Enviroment, Naresuan University .

Abstract

To study on Miang or Assam Tea (*Camellia sinensis* var. *assamica*) for responding plant Genetic Conservation Project Under the Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn (RSPG). The objective study on genetic biodiversity of physical, geographic coordinates and usefulness of Miang. We study on survey and collected sample found that wild tea have stem an average 6-18 m., large perennial plant. Survey area of Ming were evaluated 2 sources include Tambon Phu Fa, Bo Kluea district, Nan province (Coordinate: latitude 19; 54; 36.6100, longitude 101; 14; 44.9799) and Tambon Sri Na Pan, Muang, Nan province (Coordinate: latitude 19; 54; 36.6100, longitude 101; 14; 44.9799) which 2 sources ware found with above sea level of more 500 m. Survey fermentation product of Miang that both area and source ware found 2 sources include farmer of Ban Sri Napan, Tombon Reuang, Muang district, Nan province and farmer of Ban Pa Daet, Tambon Cho Hae, Muang district, Phrae province. Moreover, pH have affected temperature and period time of fermentation Miang the results showed that Miang was steamed at 40 minutes and long period time have height pH more than steam 60 and 80 minutes and titrate acidity was decreased when was fermented at 6 months.

Keywords: Miang leave tea, biodiversity, survey

คำนำ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน ให้ศึกษาความหลากหลาย การขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว และการผลิตชาเมี่ยง ภายใต้โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ (อพ.สธ.) เป็นโครงการอันเนื่องมาจากพระราชดำริของสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารีที่ทรงมีพระราชดำริให้มีการดำเนินการอนุรักษ์พืชพรรณของประเทศ โดยได้มีการจัดสร้างธนาคารพืชพรรณสำหรับการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ การเก็บรักษาโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ รวมทั้งการศึกษาด้านชีวโมเลกุล นอกจากนี้ ยังมีการดำเนินกิจกรรมในการปกปักพันธุกรรมพืช สำรวจเก็บรวบรวม ปลูกรักษา อนุรักษ์และใช้ประโยชน์ ศูนย์ข้อมูลพันธุกรรมพืช วางแผนพัฒนาพันธุ์พืช สร้างจิตสำนึกในการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช และกิจกรรมพิเศษสนับสนุนการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาความหลากหลาย การขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวชาเมี่ยง และการผลิตชาเมี่ยง โดยการสำรวจความหลากหลายของชาเมี่ยงทั้งชนิดและปริมาณ เพื่อเป็นฐานในการวิจัยและพัฒนาความหลากหลาย การอนุรักษ์ และการใช้ประโยชน์ของชาเมี่ยงให้ครบทุกด้านในระยะต่อไป อันจะเป็นประโยชน์ต่อเศรษฐกิจของประเทศไทยในวงกว้างต่อไป และเพื่อสนองโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริของสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.)

(ผศ.ดร.พีระศักดิ์ ฉายประสาท)

หัวหน้าโครงการวิจัย

พฤศจิกายน 2561

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทสรุปผู้บริหาร	ข
บทคัดย่อ	ช
คำนำ	ฌ
สารบัญ	ญ
โครงการวิจัยย่อย 1	
บทที่ 1 บทนำ	
- ที่มาและความสำคัญ	1
- วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
- ขอบเขตของโครงการวิจัย	2
- ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	2
- ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
- ชาเมี่ยง (*Camellia sinensis* var. *assamica*)	4
- การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Tissue Culture)	7
- เอเอฟแอลพี (AFLP: Amplified fragment length polymorphism)	8
- การปฏิบัติหลังการเก็บเกี่ยวที่ดีและเหมาะสม (Good Handling Practice, GHP)	9
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย	
- การสำรวจตำแหน่ง จำนวนและชนิดของชาเมี่ยง	11
- การจำแนกชนิดของชาเมี่ยง จังหวัดสุโขทัย แพร่ และน่าน	11
- การศึกษาการจำแนกลักษณะทางนิเวศวิทยาของชาเมี่ยง จังหวัดสุโขทัย แพร่ และน่าน	11
- ศึกษาลักษณะระยะพัฒนาการของต้นอ่อนชาเมี่ยงในสภาพปลอดเชื้อ	12

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย (ต่อ)

- ศึกษาผลของฮอร์โมน NAA ร่วมกับ BA ที่มีต่อการเจริญเติบโตของชาเมี่ยง ในสภาพปลอดเชื้อ 12
- ศึกษาผลของธาตุอาหารต่อการเจริญเติบโตของของชาเมี่ยง 12
- การสกัด DNA ใช้วิธีการดัดแปลงของ Doyle และ Doyle (1990) 13
- การตรวจสอบปริมาณของดีเอ็นเอ 13
- การทำปฏิกิริยา AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) ใช้วิธีการของ VOS และคณะ (1995) 13
- การตรวจผลปฏิริยา AFLP 15
- ผลของน้ำที่ใช้ในการล้างชนิดต่างๆ ที่มีผลต่อคุณภาพของชาเมี่ยง 16
- การศึกษาผลของการใช้อุณหภูมิต่ำเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาชาเมี่ยง 16

บทที่ 4 ผลการทดลอง

- การสำรวจตำแหน่ง จำนวนและชนิดของชาเมี่ยง จังหวัดสุโขทัย แพร่ และน่าน 17
- การศึกษาการจำแนกชนิด และการจำแนกลักษณะทางนิเวศวิทยาของชาเมี่ยง 18
- ศึกษาลักษณะระยะพัฒนาการของต้นอ่อนชาเมี่ยงในสภาพปลอดเชื้อ 20
- ศึกษาผลของฮอร์โมน NAA ร่วมกับ BA ที่มีต่อการเจริญเติบโตของชาเมี่ยง ในสภาพปลอดเชื้อ 21
- การสกัด DNA ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอแบบ Kit และการตรวจสอบผล 23
- การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอภายในหลอดทดลองและการตรวจสอบผล 23

บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

- สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง 28

บรรณานุกรม 31

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

โครงการวิจัยย่อย 2

บทที่ 1 บทนำ

- ที่มาและความสำคัญ 1
- วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย 3
- ขอบเขตของโครงการวิจัย 3
- ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย 4
- ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 4

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

- ชาเมี่ยง (*Camellia sinensis var. assamica*) 5
- องค์ประกอบทางเคมีในใบชาสด 7
- การพัฒนากระบวนการผลิตชาใบเมี่ยง (อบแห้ง) 9
- การพัฒนาเมี่ยง (เมี่ยงหมัก) 9
- อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ 9
- งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 10

บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย

- การสำรวจและเก็บตัวอย่าง 15
- ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิและเวลาต่อคุณภาพของใบชาอบแห้ง และคุณภาพน้ำชา 16
- ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิและระยะเวลาการนึ่งใบชาเมี่ยงต่อการหมัก และคุณภาพของเมี่ยงทางกายภาพ เคมี และจุลชีววิทยา 18

บทที่ 4 ผลการทดลอง

- การสำรวจและเก็บตัวอย่าง 20
- ขั้นตอนการหมักเมี่ยง (ชาหมัก) พื้นบ้านของเกษตรกร 22
- ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิและเวลาต่อคุณภาพของใบชาอบแห้งและคุณภาพน้ำชา 26

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 ผลการทดลอง (ต่อ)

- องค์ประกอบทางเคมีของใบเมี่ยงหมัก 26
- ค่าสี L* a* b* ใบเมี่ยงหมัก 27
- ปริมาณ DPPH radical scavenging activity FRAP ABTS และ Total phenolic content 28
- ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิและระยะเวลาการนึ่งใบชาเมี่ยงต่อการหมักและคุณภาพของเมี่ยงทางกายภาพ เคมี และจุลชีววิทยา 29
- การดำเนินการยกระดับมาตรฐานการผลิตใบชาเมี่ยงในพื้นที่ จังหวัดน่านให้เข้าสู่มาตรฐานการผลิตการปฏิบัติที่ดีในการผลิตอาหาร (GMP) 35

บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

- สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง 42

บรรณานุกรม 44

ภาคผนวก 47

สารบัญตาราง

หน้า

โครงการวิจัยย่อย 1

ตาราง 1 พื้นที่ที่พบ และแหล่งเจริญเติบโตของชาเมี่ยง 17

ตาราง 2 ไพรเมอร์จำนวน 5 ชนิด ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอภายในหลอดทดลอง
โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรส 24

โครงการวิจัยย่อย 2

ตาราง 1 องค์ประกอบทางเคมีของใบเมี่ยงหมัก 26

ตาราง 2 ค่าสี L* a* b* ใบเมี่ยงหมัก 27

ตาราง 3 แสดงปริมาณ DPPH radical scavenging activity FRAP ABTS
และ Total phenolic content 28

ตาราง 4 จำนวนจุลินทรีย์ในตัวอย่างเมี่ยง (ใบชาหมัก) 32

ตาราง 5 แสดงคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีบางประการ
ของเชื้อ Lactic acid bacteria (ใบชาหมัก) 34

สารบัญภาพ

หน้า

โครงการวิจัยย่อย 1

ภาพ 1 ลักษณะต้นของชาเมี่ยง 18

ภาพ 2 ลักษณะผลของชาเมี่ยง 18

ภาพ 3 ลักษณะใบของชาเมี่ยง 18

ภาพ 4 ลักษณะใบของชาเมี่ยง 18

ภาพ 5 ต้นพันธุ์ชาเมี่ยงสำหรับใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 20

ภาพ 6 การฟอกฆ่าเชื้อยอดชาเมี่ยงเพื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 21

ภาพ 7 ชาเมี่ยงที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อ 22

ภาพ 8 ผลการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของชาเมี่ยงจำนวน 15 ตัวอย่าง 23

ภาพ 9 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอภายในหลอดทดลอง หรือ ผลผลิตพีซีอาร์ โดยไพรเมอร์ Scot 1 24

ภาพ 10 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอภายในหลอดทดลอง หรือ ผลผลิตพีซีอาร์ โดยไพรเมอร์ Scot 2 25

ภาพ 11 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอภายในหลอดทดลอง หรือ ผลผลิตพีซีอาร์ โดยไพรเมอร์ Scot 3 25

ภาพ 12 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอภายในหลอดทดลอง หรือ ผลผลิตพีซีอาร์ โดยไพรเมอร์ RAPD-K1 26

ภาพ 13 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอภายในหลอดทดลอง หรือ ผลผลิตพีซีอาร์ โดยไพรเมอร์ RAPD-OPA02 26

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

โครงการวิจัยย่อย 2

ภาพ 1 องค์ประกอบทางเคมีของใบชาสด 8

ภาพ 2 ลักษณะต้นของชาเมี่ยง 21

ภาพ 3 ลักษณะใบของชาเมี่ยง 21

ภาพ 4 ลักษณะยอดชาเมี่ยง 21

ภาพ 5 ลักษณะใบชาหมัก 21

ภาพ 6 ขั้นตอนการผลิตชาเมี่ยงของเกษตรกร บ้านศรีนาป่าน ตำบลเรือง อำเภอเมือง จังหวัดน่าน 22

ภาพ 7 ขั้นตอนการผลิตชาเมี่ยงของเกษตรกร บ้านป่าแดด ตำบลช่อแฮ อำเภอเมือง จังหวัดแพร่ 25

ภาพ 8 การเปลี่ยนแปลงค่า pH ของกระบวนการผลิตชาใบเมี่ยง (เมี่ยงหมัก) 26

ภาพ 9 %Acidity ของกระบวนการผลิตชาใบเมี่ยง (เมี่ยงหมัก) 27

ภาพ 10 ลักษณะชาเมี่ยง (ชาป่า) หรือ ชาอัสสัม 31

ภาพ 11 ลักษณะบอกนึ่งเมี่ยง 31

ภาพ 12 อุปกรณ์ในการเก็บใบเมี่ยงสด 31

ภาพ 13 ลักษณะใบเมี่ยง (ใบที่ 4-6) 31

ภาพ 14 การเรียงใบเมี่ยงสดในบอกนึ่งเมี่ยง 32

ภาพ 15 การนึ่งเมี่ยง 32

ภาพ 16 ลักษณะเมี่ยงนึ่ง 32

ภาพ 17 ลักษณะเมี่ยงหมัก 32

ภาพ 18 อุปกณ์การผลิตผลิตภัณฑ์จากชาเมี่ยง 32

ภาพ 19 ห้องบรรจุผลิตภัณฑ์จากชาเมี่ยง 32

ภาพ 20 การลงทะเบียนอบรม 33

ภาพ 21 วิทยากรบรรยาย 33

สารบัญภาพ (ต่อ)

		หน้า
ภาพ 22	วิทยากรบรรยาย	33
ภาพ 23	ทำแบบสอบถาม	33
ภาพ 24	แผนภาพแสดงร้อยละของการประเมินระดับความพึงพอใจการประชาสัมพันธ์ โครงการอบรมหลักปฏิบัติที่ดีในการผลิต ผลิตภัณฑ์ชาและเมี่ยง	35
ภาพ 25	แผนภาพแสดงร้อยละของการประเมินระดับความพึงพอใจ ความเหมาะสมของสถานที่การจัดอบรมหลักปฏิบัติที่ดีในการผลิต ผลิตภัณฑ์ชาและเมี่ยง	35
ภาพ 26	แผนภาพแสดงร้อยละของการประเมินระดับความพึงพอใจ ความเหมาะสมของรูปแบบการจัดการในการลงทะเบียน หลักปฏิบัติที่ดีในการผลิต ผลิตภัณฑ์ชาและเมี่ยง	36
ภาพ 27	แผนภาพแสดงร้อยละของการประเมินระดับความพึงพอใจ เอกสารประกอบโครงการอบรมหลักปฏิบัติที่ดีในการผลิต ผลิตภัณฑ์ชาและเมี่ยง	36
ภาพ 28	แผนภาพแสดงร้อยละของการประเมินระดับความพึงพอใจ การอำนวยความสะดวกของเจ้าหน้าที่ของโครงการอบรมหลักปฏิบัติที่ดีในการผลิต ผลิตภัณฑ์ชาและเมี่ยง	37
ภาพ 29	แผนภาพแสดงร้อยละของการประเมินระดับความพึงพอใจ ความเหมาะสมของระยะเวลาของการจัดอบรมหลักปฏิบัติที่ดีในการผลิต ผลิตภัณฑ์ชาและเมี่ยง	37
ภาพ 30	แผนภาพแสดงร้อยละของการประเมินระดับความพึงพอใจ อาหารและเครื่องดื่มของโครงการอบรมหลักปฏิบัติที่ดีในการผลิต ผลิตภัณฑ์ชาและเมี่ยง	38
ภาพ 31	แผนภาพแสดงร้อยละของการประเมินระดับความพึงพอใจ มีความเข้าใจเข้าใจเกี่ยวกับการผลิตชา – เมี่ยง ให้มีคุณภาพดีและปลอดภัยต่อผู้บริโภค โครงการอบรมหลักปฏิบัติที่ดีในการผลิต ผลิตภัณฑ์ชาและเมี่ยง	38
ภาพ 32	แผนภาพแสดงร้อยละของการประเมินระดับความพึงพอใจผู้เข้าร่วมอบรมได้รับความรู้ความเข้าใจในหลักการปฏิบัติที่ดีในการผลิตอาหาร (จีเอ็มพี.) มากน้อยเพียงใด โครงการอบรมหลักปฏิบัติที่ดีในการผลิต ผลิตภัณฑ์ชาและเมี่ยง	39

ภาพ 33 แผนภาพแสดงร้อยละของการประเมินระดับความพึงพอใจ ผู้เข้าอบรมท่านสามารถนำความรู้ที่ได้ไปพัฒนาการผลิตชา – เมี่ยง ของตนเองได้มากน้อยเพียงใด โครงการอบรมหลักปฏิบัติที่ดีในการผลิต ผลิตภัณฑ์ชาและเมี่ยง 39

ภาพ 34 แผนภาพแสดงร้อยละของการประเมินระดับความพึงพอใจ ท่านสามารถนำความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นได้มากน้อยเพียงใด โครงการอบรมหลักปฏิบัติที่ดีในการผลิต ผลิตภัณฑ์ชาและเมี่ยง 40

ภาพ 35 แผนภาพแสดงร้อยละของการประเมินระดับความพึงพอใจ มีความพึงพอใจโดยรวมต่อวิทยากรมากน้อยเพียงใด โครงการอบรมหลักปฏิบัติที่ดีในการผลิต ผลิตภัณฑ์ชาและเมี่ยง 40

ภาพ 36 แผนภาพแสดงร้อยละของการประเมินระดับความพึงพอใจ มีความพึงพอใจโดยรวมต่อวิทยากรมากน้อยเพียงใด โครงการอบรมหลักปฏิบัติที่ดีในการผลิต ผลิตภัณฑ์ชาและเมี่ยง 41

มหาวิทยาลัยนเรศวร

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์โครงการ

โครงการ การศึกษาความหลากหลาย การขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวเมี่ยง

Biodiversity Micropropagation and Postharvest Technology of Miang (*Camellia sinensis* var. *assamica*)

คณะผู้วิจัย สังกัด

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พีระศักดิ์ ฉายประสาท[1]
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุญส่ง แสงอ่อน[2]
นายพุทธพงษ์ สร้อยเพชรเกษม[1]

[1]ภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร
คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติ และสิ่งแวดล้อม
มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก
[2]ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร
คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติ และสิ่งแวดล้อม
มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

สนับสนุนโดย
งบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยนเรศวร
ประจำปีงบประมาณ 2560

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ (อพ.สธ.) ได้เริ่มดำเนินการในเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2535 เป็นโครงการอันเนื่องมาจากพระราชดำริของสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ที่ทรงมีพระราชดำริให้มีการดำเนินการอนุรักษ์พืชพรรณของประเทศ โดยได้มีการจัดสร้างธนาคารพืชพรรณสำหรับการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ การเก็บรักษาโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ รวมทั้งการศึกษาด้านชีวโมเลกุล นอกจากนี้ ยังมีการดำเนินกิจกรรมในการปกปักพันธุกรรมพืช สำรวจเก็บรวบรวม ปลูกรักษา อนุรักษ์และใช้ประโยชน์ ศูนย์ข้อมูลพันธุกรรมพืช วางแผนพัฒนาพันธุ์พืช สร้างจิตสำนึกในการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช และกิจกรรมพิเศษสนับสนุนการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช

ชาเมี่ยงหรือชาอัสสัม (*Camellia sinensis* var. *assamica*) คือ ชาพื้นเมืองที่ขึ้นตามป่า ลักษณะเป็นลำต้นเดี่ยว สูงประมาณ 6-18 เมตร มีใบใหญ่ เจริญเติบโตได้เร็ว เป็นไม้ยืนต้นขนาดใหญ่ (Van der Vossen and Wessel, 2000) องค์ประกอบที่สำคัญในชาประกอบด้วยสารโพลีฟีนอล (polyphenol) ร้อยละ 20-35 ซึ่งจะมีปริมาณลดลงเมื่อใบมีอายุมากขึ้น (Chu and Juneja, 1999) เป็นผลิตภัณฑ์ท้องถิ่นทางภาคเหนือของประเทศไทยหลายจังหวัด ได้แก่ เชียงใหม่ เชียงราย น่าน แพร่ สุโขทัย และจังหวัดอุตรดิตถ์ ลักษณะทั่วไปเป็นใบเดี่ยว ปลายแหลม ใบมีความกว้างประมาฯ 17-22 เซนติเมตร มีขั้นตอนโดยการนำใบชาสดมามัดเป็นกำ นึ่งแล้วหมักทิ้งไว้จนใบชาเปลี่ยนสภาพเป็นสีเหลือง เมื่อใบยุ่ย จึงจะสามารถนำบริโภค นิยมใช้เป็นของขบเคี้ยวหรืออมเป็นของว่างระหว่างการทำงาน หรือชงดื่มกับน้ำร้อน ช่วยผ่อนคลายความเหน็ดเหนื่อย ปัจจุบันมีอยู่หลายชนิด เช่น เมี่ยงหวาน เมี่ยงเค็ม เมี่ยงหมี่ เมี่ยงขิง เมี่ยงใส่กระเทียมดอง ชาเมี่ยงเป็นแหล่งสำคัญของคาเทชิน (catechin) โดยมีปริมาณสูงถึง 30 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง อยู่ในกลุ่มฟีนอลซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชันที่มีคุณภาพสูง และยังพบ theaflavins, thearubigins ในชาเมี่ยงอีกด้วย (สุรัติวดี ภาคอุทัย, 2551) คาเชทิน (catechin) ในชานั้นพบว่าเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ที่ดีกว่าวิตามิน C, E, tocopherols และ β-carotene (Tang and Meydani, 2001) โดยพบว่าสารสกัดคาเทชิน (catechin) บริสุทธิ์ มีคุณสมบัติในอนุมูลอิสระได้ไม่ดีเท่ากับ crude extract ของชา (Vinson and Dabbagh, 1998) Lin และคณะ (2000) สารโพลีฟีนอลโดยเฉพาะสารคาเทชิน (catechin) มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ (antioxidative) ต้านจุลชีพ (antibacterial) และลดอาการภูมิแพ้ (antiallergic activities) (Yen and Chen, 1995; Kumamoto and Sonda, 1998; Yang, 1998)

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1) เพื่อสนองโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ (อพ.สธ.)
2) เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา และพิกัดภูมิศาสตร์ของชาเมี่ยง
3) เพื่อใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดเอเอฟแอลพี (AFLP) ในการตรวจสอบสายพันธุ์ชาเมี่ยงเพื่อใช้ในการเก็บรักษาพันธุกรรมต่อไปและใช้เป็นหลักฐานในการจดทะเบียนคุ้มครอง
4) เพื่อศึกษาการขยายพันธุ์ชาเมี่ยงโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
5) เพื่อศึกษาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวชาเมี่ยงที่เหมาะสม
6) เพื่อให้บริการสืบค้นข้อมูลสารสนเทศทางอินเตอร์เน็ตเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรม การผลิตและการปฏิบัติหลังการเก็บเกี่ยวชาเมี่ยงคุณภาพดี

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

โครงการวิจัยนี้เป็นการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาและพิกัดภูมิศาสตร์ เพื่อใช้ในการอนุรักษ์ จัดจำแนกด้วยเทคนิค AFLP และการขยายพันธุ์ชาเมี่ยงด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ตลอดจนเทคโนโลยีการผลิตและหลังการเก็บเกี่ยวเชิงพาณิชย์

1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ในการอนุรักษ์ความหลากหลายทางพันธุกรรมพืช โดยการสำรวจ การจัดจำแนกชนิดของชาเมี่ยงที่ไม่สามารถจะจำแนกได้อย่างชัดเจน จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา นอกจากนี้ยังเป็นประโยชน์ต่อการผสมพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์ชาเมี่ยงในอนาคต

การผลิตและการประเมินการสูญเสียหลังการเก็บเกี่ยวตั้งแต่เก็บเกี่ยวจนกระทั่งการวางจำหน่าย ตลอดจนการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวที่เหมาะสม ซึ่งจะเป็นแนวทางในการปรับปรุงคุณภาพชาเมี่ยงให้มีคุณภาพ และสรรพคุณทางยาดีสม่ำเสมอ เป็นที่ต้องการของตลาดต่างประเทศมากขึ้น อันจะเป็นการเพิ่มรายได้แก่เกษตรกรผู้ปลูกชาเมี่ยงและผู้สนใจ ตลอดจนการเพิ่มศักยภาพในการแข่งขันของประเทศในการส่งออกอีกแนวทางหนึ่งด้วย

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ผลสำเร็จของการวิจัยที่คาดว่าจะได้รับ

1) สามารถจำแนกชนิดของชาเมี่ยงโดยใช้สัณฐานวิทยา และการจัดจำแนกโดยเทคนิค AFLP

2) เพื่อทราบข้อมูลการขยายพันธุ์ชาเมี่ยง โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

3) อนุรักษ์พันธุ์ชาเมี่ยง ในเขตพื้นที่ จังหวัดสุโขทัย ตาก และน่าน เพื่อเป็นแหล่งทางพันธุกรรมของท้องถิ่น

4) ทราบข้อมูลเกี่ยวกับจำนวน และพันธุ์ชาเมี่ยง ที่พบในเขตพื้นที่ จังหวัดสุโขทัย ตาก และน่าน

1.5.2 หน่วยงานที่นำผลวิจัยไปใช้ประโยชน์

1) โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตน ราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

2) ประชาชนที่อาศัยบริเวณ จังหวัดสุโขทัย ตาก และน่าน

3) เกษตรกร ผู้สนใจทั่วไปในเขตภาคเหนือตอนล่าง

4) นักวิจัยในสถาบันต่างๆ

5) นิสิต นักศึกษาในสถาบันต่างๆ

6) นักวิชาการเกษตร กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ (อพ.สธ.) ได้เริ่มดำเนินการในเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2535 เป็นโครงการอันเนื่องมาจากพระราชดำริของสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารีที่ทรงมีพระราชดำริให้มีการดำเนินการอนุรักษ์พืชพรรณของประเทศ โดยได้มีการจัดสร้างธนาคารพืชพรรณสำหรับการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ การเก็บรักษาโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ รวมทั้งการศึกษาด้านชีวโมเลกุล นอกจากนี้ ยังมีการดำเนินกิจกรรมในการปกปักพันธุกรรมพืช สำรวจเก็บรวบรวม ปลูกรักษา อนุรักษ์และใช้ประโยชน์ ศูนย์ข้อมูลพันธุกรรมพืช วางแผนพัฒนาพันธุ์พืช สร้างจิตสำนึกในการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช และกิจกรรมพิเศษสนับสนุนการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช ซึ่งชาเมี่ยงเป็นหนึ่งใน 8 พืชที่อยู่ภายใต้โครงการสำรวจความหลากหลายของพันธุ์พืชอนุรักษ์ (อพ.สธ.)

การศึกษาสถานการณ์ในปัจจุบันของชาในประเทศไทย พบว่าสายพันธุ์ชาที่ปลูกแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ พันธุ์ชาอัสสัม (*Camellia sinensis* var. *assamica*) และพันธุ์ชาจีน (*Camellia sinensis* var. *sinensis*) กลุ่มพันธ์ชาอัสชัมบางครั้งเรียกว่า ชาพื้นเมือง ชาป่า หรือชาเมี่ยง เป็นชนที่มีใบขนาดใหญ่เจริญได้ดีตามป่าที่มีร่มไม้กลุ่มพันธุ์ชาจีนที่มีใบขนาดเล็กกว่าชาอัสสัม พบได้หลายสายพันธุ์ ได้แก่ ชาพันธุ์อู่หลงเบอร์ 17 อู่หลงเบอร์ 12 ชิงชิงอู่หลง ถิกวนอิม และสี่ฤดูเป็นต้น ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกชาทั้งสิ้น 118,101 ไร่ คิดเป็นพื้นที่ปลูกชาอัสสัม 84.4% (98,544 ไร่) และชาจีน 16.6% (19,557) ราคาขายใบชาสดและใบชาจีนสดเฉลี่ย 12 และ 50 บาทต่อกิโลกรัม ในปีพ.ศ. 2550 ประเทศไทยผลิตใบชาสดทั้งสิ้น 81,074 ตัน ซึ่งใบชาสด 77% นำมาผลิตเป็นชาแห้ง และ 23% นำไปผลิตเป็นเมี่ยง ในการผลิตชาแห้งใช้ชาอัสสัมคิดเป็น 96% ที่เหลือเป็นชาจีน ส่วนการผลิตเมี่ยงใช้เฉพาะชาอัสสัม (สายลม สัมพันธ์เวชโสภา และคณะ. 2550)

ชาเมี่ยง (*Camellia sinensis* var. *assamica*) แต่เดิมชาเป็นพืชท้องถิ่นของประเทศจีน ต่อมามีการแพร่ขยายมายังประเทศไทย ชาเมี่ยงเป็นผลิตภัณฑ์ท้องถิ่นทางภาคเหนือของประเทศไทยหลายจังหวัด อาทิ จังหวัดแม่ฮ่องสอน จังหวัดเชียงราย จังหวัดลำปาง จังหวัดแพร่ และจังหวัดเชียงใหม่ เป็นต้น ลักษณะทั่วไปเป็นใบเดี่ยว ปลายแหลม ใบมีความกว้าง เป็น 17-22 เซนติเมตร ขอบใบมีหยักเป็นฟันเลื่อยเด่นชัด ส่วนของก้านใบและด้านท้องใบมีขนปกคลุม แผ่นใบมีตั้งแต่สีเขียวอ่อนจนถึงสีเขียวเข้ม ชาเมี่ยงมี

ขั้นตอนโดยการนำใบชาสดมามัดเป็นกำ นึ่งแล้วหมักทิ้งไว้จนใบชาเปลี่ยนสภาพเป็นสีเหลือง ใบยุ่ย จึงนำมาบริโภค นิยมใช้เป็นของขบเคี้ยวหรืออมเป็นของว่างระหว่างการทำงาน ยามว่างหลังอาหารหรือชงดื่มกับน้ำร้อน ช่วยผ่อนคลาย ความเหน็ดเหนื่อย ปัจจุบันมีอยู่หลายชนิด อาทิ เมี่ยงหวาน เมี่ยงเค็ม เมี่ยงหมี่ เมี่ยงขิง เมี่ยงใส่กระเทียมดอง ชาเมี่ยงเป็นแหล่งสาคัญของคาเทชิน (catechin) โดยมีปริมาณสูงถึง 30 เปอร์เซ็นต์ของน้าหนักแห้ง อยู่ในกลุ่มฟีนอลซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชันที่มีคุณภาพสูง และยังพบ theaflavins, thearubigins ในชาเมี่ยง (สุรัติวดี ภาคอุทัย, 2551)

ชาเมี่ยง หรือชา บ้านห้วยน่านจัดอยู่กลุ่มพันธุ์ชาอัสสัม (*Camellia sinensis* var. *assamica*) สามารถเจริญเติบโตเร็ว ทนแล้ง ปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อมได้ดี พื้นที่ปลูกที่เหมาะสมตั้งแต่ 100 –1,000 เมตร ชาอัสสัมมีคาเฟอีนมากกว่าชาจีน ชาอัสสัม 1 กิโลกรัม มียอดชาสดประมาณ 700 ยอด ชาอัสสัม สามารถแบ่งออกเป็นพันธุ์ย่อยได้ 5 สายพันธุ์ คือ

1. พันธุ์อัสสัมใบจาง (Light leaved Assam Jat) ต้นมีขนาดเล็ก ยอดและใบมีสีเขียวอ่อน ลักษณะใบเป็นมันวาว ขอบใบหยักแบบฟันเลื่อย เป็นพันธุ์ที่อ่อนแอ ให้ผลผลิตต่ำและคุณภาพไม่ดี เมื่อนำมาทำชาจีนจะมีสีน้ำตาล

2. พันธุ์อัสสัมใบเข้ม (Dark leaved Assam Jat) ยอดและใบมีสีเขียวเข้ม ใบนุ่มเป็นมัน มีขนปกคลุม ขอบใบหยักแบบฟันเลื่อย เป็นพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงและมีคุณภาพดี เมื่อนำมาทำชาจีนจะมีสีดำ

3. พันธุ์มานิปุริ (Manipuri Jat) เป็นพันธุ์ที่แข็งแรง ให้ผลผลิตสูง ใบมีสีเขียวเข้มเป็นประกาย ขอบใบหยักแบบฟันเลื่อย ทนแล้งได้ดี

4. พันธุ์พม่า (Burma jat) ใบมีสีเขียวเข้ม ใบแก่มีสีเขียวแกมน้ำเงิน ใบกว้าง แผ่นใบรูปไข่ ขอบใบหยักแบบฟันเลื่อย ทนต่อสภาพแวดล้อมได้ดีมาก

5. พันธุ์ลูไช (Lushai jat) ขอบใบหยักลึก ปลายใบเห็นได้ชัด (ศูนย์ศึกษาและพัฒนาวนศาสตร์ชุมชนที่ 2 (เชียงราย). 2553)

การผลิตเมี่ยงได้ทำสืบทอดมาจากบรรพบุรุษ พื้นที่ปลูกชาอัสสัมสำหรับผลิตเมี่ยง 41,946 ไร่ โดยนำชาอัสสัม หรือชาเมี่ยง มานึ่ง มัดเป็นก้อน และหมักในถังหมัก ใบเมี่ยงสด 100 ตันจะผลิตเมี่ยงได้โดยเฉลี่ย 144 ตัน มีน้ำนึ่งและน้ำหมักซึ่งเป็นของเสียระหว่างการนึ่งและการหมักเกิดขึ้น 15 และ 20 ตัน

ตามลำดับ ผลิตภัณฑ์เมี่ยงมีรสชาติฝาดถึงเปรี้ยว พบว่าการบริโภคเมี่ยงในเขตภาคเหนือของไทยจะนิยมบริโภคยามว่างขณะทำงานเพื่อความกระชุ่มกระชวย อาจมีการเติมเกลือ น้ำตาล ขิง แล้วแต่วัฒนธรรมการกินในแต่ละท้องถิ่น นอกจากนี้เมี่ยงยังใช้ในงานพิธีกรรม หรือบรวงสรวงต่างๆ ในท้องถิ่นภาคเหนือ การปลูกชาเพื่อผลิตชาแห้ง จะตัดแต่งกิ่ง 2 รูปแบบคือ ตัดแต่งกิ่งเล็ก และตัดแต่งกิ่งใหญ่ การตัดแต่งกิ่งเล็กจะทำทุกครั้ง หลังจากเก็บชา ส่วนการตัดแต่งกิ่งใหญ่ซึ่งจะทำการตัดแต่งปีละ 1 ครั้ง ในช่วงปลายปีของทุกปี มีปริมาณของเสียทั้งหมด 531,455 ตันต่อปี หรือเฉลี่ย 4.5 ตันต่อไร่ ของเสียประกอบด้วยใบอ่อน 4.9% ใบแก่ 24.1% กิ่ง ก้าน 67.2% และเมล็ด 3.8% ส่วนการปลูกชาเมี่ยงเพื่อผลิตเมี่ยงมีการตัดแต่งกิ่ง 1 ครั้งต่อปี ได้ ของเสีย 36,912 ตันต่อปี หรือเฉลี่ย 0.9 ตันต่อไร่ ของเสียประกอบด้วย ใบอ่อน 55% ใบแก่ 18% และเมล็ด 27% ซึ่งของเสียที่เกิดขึ้นทั้งหมด ผู้ปลูกชามักนำไปทำเป็นชาที่มีคุณภาพต่ำนำไปหมักเป็นปุ๋ยเพื่อบำรุงรักษาต้นชา

ผลิตภัณฑ์เมี่ยง ผลิตจากชาเมี่ยง (ชาป่า) หรือ ชาอัสสัม (*Camellia sinensis* var. *assamica*) ชาอัสสัม มีแหล่งกำเนิดมาจากประเทศอินเดีย ชาอัสสัมมีลักษณะใบชาที่ใหญ่กว่าชาสายพันธุ์จีนที่ เป็นพันธุ์ชาที่เจริญเติบโตได้ดีตามป่า มีร่มไม้ และแสงแดดผ่านได้พอประมาณ ชาอัสสัมส่วนมากมักพบบนเขตพื้นที่สูงหรือบนดอยต่าง ๆ ในเขตจังหวัดภาคเหนือ

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ (สายลม และคณะ, 2551)

ลำต้น : เป็นไม้พุ่มขนาดกลาง–ใหญ่ ผิวลำต้นเรียบ กิ่งอ่อนปกคลุมด้วยขนอ่อน ชาในกลุ่มนี้มีลักษณะเป็นไม้ขนาดใหญ่ อาจสูงถึง 17.0 เมตร และมีขนาดใหญ่กว่าชาในกลุ่มชาจีนอย่างเด่นชัด กิ่งที่มีอายุมากจะเปลี่ยนเป็นสีเทา

ใบ : มีลักษณะเป็นใบเดี่ยว ปลายใบแหลม การเรียงตัวของใบบนกิ่งเป็นแบบสลับและเวียน (spiral) ใบมีความกว้างประมาณ 3.0 – 6.0 เซนติเมตร ยาวประมาณ 7.0 – 16.0 เซนติเมตร แต่อาจพบใบที่มีขนาดใหญ่กว่าที่กล่าว คือมีใบกว้าง 5.6 – 7.5 เซนติเมตร ยาวประมาณ 17.0 – 22.0 เซนติเมตร ขอบใบมีหยักเป็นฟันเลื่อยเด่นชัด จำนวนหยักฟันเลื่อยเฉลี่ยประมาณ 9 หยัก ต่อความยาวขอบใบ 1 นิ้ว ส่วนของก้านใบและด้านท้องใบมีขนอ่อนปกคลุม แผ่นใบมีตั้งแต่สีเขียวอ่อนถึงสีเขียวเข้ม

ดอก : เจริญจากตาบริเวณซอกใบบนกิ่ง ในแต่ละตาประกอบด้วยตาที่จะเจริญไปเป็นกิ่งใบอยู่ด้านบนของตา ส่วนใหญ่ดอกออกติดกันเป็นกลุ่ม ช่อละประมาณ 2 – 4 ดอก/ตา ก้านดอกยาวประมาณ 10.0 – 12.0 มิลลิเมตร กลีบเลี้ยงมีจำนวน 5 – 6 กลีบ แต่ละกลีบมีขนาดไม่เท่ากัน มีรูปทรงโค้งมน กลีบดอกติดอยู่กับวง corolla ที่มีลักษณะคล้ายถ้วยหงาย กลีบดอกมีจำนวน 5 – 6 กลีบ ส่วนโคนกลีบติดกับฐานดอกแคบ ส่วนปลายกลีบบานออก วงเกสรตัวผู้ประกอบด้วยอับละอองเกสรสีเหลือง ติดอยู่ที่ส่วนปลายของก้านชูอับละอองเกสรสีขาว ซึ่งยาวประมาณ 5.0 มิลลิเมตร เกสรตัวเมีย (style) มีลักษณะเป็นก้านกลมภายในรังไข่แบ่งออกเป็น 1 – 3 ช่อง ดอกเมื่อบานเต็มที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3.65 เซนติเมตร

ผล : เป็นผลชนิดแคปซูล ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 11.0 – 12.0 มิลลิเมตร ผิวของเมล็ดเรียบ แข็ง มีสีน้ำตาล หรือ น้ำตาลอมแดง หรือน้ำตาลเข้มเกือบดำ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Tissue Culture) เปนอีกวิธีหนึ่งของเทคโนโลยีดานการเกษตรชนิดอื่นที่นอกเหนือจากพืชสวน พืชไรไม่ดอก เชนการเพาะเลี้ยงเยื่อสมุนไพรเพราะวิธีการนี้สามารถขยายพันธุไดเร็วและจำนวนมาก แตมีขอเสียอยูคือตนทุนในการจัดตั้งหองปฏิบัติการคอนขางสูง และขั้นตอนในการปฏิบัติการขยายพันธุคอนขางยากถาเทียบกับการขยายพันธุไมดอก กลวยไมหรือไมประดับ เพราะวาสมุนไพรในแตละชนิดจะมียาง ซึ่งในยางนั้นจะมีตัวยาแตกตางกันไป และตัวยาในยางของสมุนไพรนี่เองที่มักจะทำปฏิกริยากับธาตุอาหารสังเคราะหที่ใชเลี้ยงตนพืชสมุนไพร บางครั้งอาจทำใหนั้นไมเจริญเติบโตไมแตกกอไมดูดสารอาหาร และจะทำใหพืชนั้นตายในที่สุดแตถาหากทดลองสูตรอาหารไดสูตรที่เหมาะสมกับพืชนั้นๆ ก็จะเจริญเติบโตไดดีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คือการนำสวนใดสวนหนึ่งของพืชไมวาจะเป็นส่วนเนื้อเยื่ออวัยวะตางๆของพืชหรือเซลลมาเลี้ยงในสภาพที่ปลอดเชื้อจุลินทรียโดยมการควบคุมสภาพแวดลอม เช่น อุณหภูมิแสงความชื้นสวนตางๆ ของพืชเหลานี้จะสามารถเจริญเติบโตพัฒนาเปนตนใหมโดยที่พืชทุกตนจะมีลักษณะเหมือนกันดวยเหตุนี้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจึงมีประโยชนอยางกวางขวางในหลายสาขา เชน ทางดานการเกษตรทำใหสามารถขยายพันธุไดจำนวนมากในเวลาอันรวดเร็ว หรือสามารถผลิตตนพันธุที่ปลอดเชื้อไดจำนวนมากและยังสามารถสรางพันธุใหมๆ ไดโดยการเพาะเลี้ยงคัพภะ (Embryo) อับละอองเกสร (Another Culture) นอกจากนี้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชยังมีความสำคัญ สำหรับการเก็บรักษาพันธุพืชในสภาพปลอดเชื้อได้

เอเอฟแอลพี

เอเอฟแอลพี (AFLP: Amplified fragment length polymorphism) เป็นการประยุกต์อีกแบบโดยนำเอนไซม์ตัดจำเพาะมาตัด DNA ที่ต้องการตรวจสอบก่อนเพื่อให้ได้ชิ้น DNA ขนาดต่าง ๆ กันคล้ายกับการทำเทคนิค RFLP แล้วจึงเพิ่มปริมาณ DNA เพียงบางชิ้นเนื่องจากถ้าเพิ่มปริมาณ DNA ที่ตัดได้ทั้งหมดจะมีปริมาณมากจนไม่สามารถตรวจสอบได้ในการทำด้วยเทคนิค RFLP ใช้วิธีไฮบริไดเซชั่นเพื่อให้โพรบจับกับ DNA ที่จำเพาะเพียง 1-2 หรือจำนวนน้อยชิ้นในการทำ AFLP ใช้วิธีต่อ adapter เข้าไปที่ปลายของชิ้น DNA ที่ตัดไว้ทั้งหมดแล้วเลือกเพิ่มปริมาณเพียงบางชิ้นด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสเหมือนกับส่วน adapter ที่ต่อเข้าไปต่อด้วยลำดับเบสที่เป็นตำแหน่งตัดของเอนไซม์และเพิ่มเบสอื่น ๆ อีก 1-4 เบสทางปลาย 3’ ส่วนของเบสที่เพิ่มเข้าไปนี้เรียกว่าเบสคัดเลือก (selective base) ซึ่งจะทำให้ไพรเมอร์จับกับDNA ต้นแบบหรือชิ้น DNA ที่ตัดไว้ได้เพียงบางส่วนเฉพาะชิ้นที่มีลำดับเบสส่วนที่อยู่ติดกับตำแหน่งตัดจำเพาะสอดคล้องกับเบสคัดเลือกที่เพิ่มเข้าไปเท่านั้น ดังนั้นถ้าเพิ่มเบสคัดเลือก 1 เบสไพรเมอร์นั้นจะมีโอกาสจับได้สมบูรณ์กับชิ้น DNA ประมาณ 1 ใน 4 ของชิ้น DNA ทั้งหมดด้วยวิธีการนี้เมื่อเพิ่มเบสคัดเลือกมากขึ้นจำนวนชิ้น DNA ที่สามารถเพิ่มปริมาณได้จะลดลงเรื่อย ๆ ประมาณ 4 เท่าทุก ๆ 1 เบสที่เพิ่มเข้าไป (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2545)

การตัด DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจะใช้เอนไซม์ 2 ชนิด adapter ที่ใช้จึงมี 2 ชนิดไพรเมอร์ก็จะมี 2 ชนิดตามชนิดของ adapter และตำแหน่งตัดจำเพาะหลังจากการปรับจำนวนเบสคัดเลือกที่ปลาย 3’ ของไพรเมอร์ให้เหมาะสมกับ genome ของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษาจำนวนชิ้น DNA ที่สามารถเพิ่มปริมาณได้จะพอเหมาะสำหรับการแยกและตรวจสอบโดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสนอกจากจำนวนแล้วยังสามารถปรับเปลี่ยนชนิดของเบสคัดเลือกได้ทำให้สามารถใช้ไพรเมอร์หลายแบบนำมาเพิ่มปริมาณ DNA ได้ลายพิมพ์ต่าง ๆ กันเทคนิค AFLP จึงตรวจสอบ DNA ได้ครั้งละหลายตำแหน่งมีลักษณะแบบสุ่มทั้ง genome ทำได้โดยไม่ต้องทราบข้อมูลลำดับเบสของสิ่งมีชีวิตมาก่อนเช่นเดียวกับเทคนิค RAPD (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2545)

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. (2545). จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี.กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การปฏิบัติหลังการเก็บเกี่ยวที่ดีและเหมาะสม (Good Handling Practice, GHP) จะช่วยลดการสูญเสียหลังการเก็บเกี่ยวและยืดอายุการเก็บรักษาผลไม้ได้แก่

1. การใช้อุณหภูมิต่ำในการเก็บรักษา

การเก็บรักษาเป็นการปรับปัจจัยต่าง ๆ รอบผลิตผลเพื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุด และในขณะเดียวกันสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่จะเข้าทำลายผลิตผลหลังการเก็บเกี่ยวนั้น เนื่องจากการลดอุณหภูมิเป็นการลดอัตราการหายใจและเมตาบอลิซึมต่างๆ ทำให้สามารถยืดอายุการเก็บรักษาผักและผลไม้สดได้ หากอุณหภูมิต่ำเกินไปอาจเป็นอันตรายต่อพืช เรียกว่าอาการ Chilling Injury (CI) ลักษณะที่ปรากฏได้แก่ การเน่าเสีย สีผิดปกติ รอยช้ำ รอยบุ๋ม เนื้อฉ่ำน้ำผิดปกติ การสุกไม่สม่ำเสมอเป็นต้น (Will, et. al, 1981)

2. การเคลือบผิว เป็นวิธีหนึ่งที่สามารถยืดอายุการเก็บรักษาผลิตผลได้ ซึ่งจัดเป็นการเก็บรักษาผลิตผลแบบดัดแปลงสภาพบรรยากาศ เพราะการเคลือบผิวจะเป็นการจำกัดการแลกเปลี่ยนก๊าซภายในผลิตผลทำให้ปริมาณก๊าซ CO2 ซึ่งเกิดจากการหายใจมีมาก และมีผลไปยับยั้งการทำงานของเอทิลีน การใช้สารเคลือบผิวควรเลือกชนิดและระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมกับผลไม้แต่ละชนิด (จริงแท้, 2538)

ไคโตแซน (chitosan) เป็นอนุพันธุ์ของไคติน (chitin) ซึ่งเป็นโพลีเมอร์ชีวภาพในกลุ่มคาร์โบไฮเดรตที่มีมากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลส (cellulose) ไคตินมีสูตรโครงสร้างคล้ายคลึงกับเซลลูโลสซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ของพืช แต่ไคตินเป็นโพลีเมอร์ในสัตว์ ไคตินและไคโตแซนเป็นองค์ประกอบของเซลล์ในลักษณะเส้นใย (fiber) ที่ทำหน้าที่ยึดสารต่าง ๆ ให้เป็นแผ่นและเป็นเส้นที่แข็งแรงสามารถห่อหุ้มอวัยวะของสิ่งมีชีวิตได้ ทำให้มีคุณสมบัติป้องกันการเข้าทำลายของโรคหลังการเก็บเกี่ยวในไม้ผลหลายชนิด ได้แก่ สตรอเบอรี่ ลำไย และลิ้นจี่เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถถูกย่อยสลายได้ง่ายตามธรรมชาติ ดังนั้นจึงเป็นสารที่มีความปลอดภัยในการใช้กับมนุษย์ สัตว์และสิ่งแวดล้อม (Austin, et. al, 1981)

3. การยืดอายุการเก็บรักษาด้วยสารเคมี

การใช้ 1-Methylcyclopropene (1-MCP) ความเข้มข้นที่ต่ำสามารถยับยั้งการทำงานของเอทิลีนและยืดอายุการเก็บรักษาผักและผลไม้ได้ คุณสมบัติของ 1-MCP ได้แก่ สถานะเป็นก๊าซมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 54 สูตรโครงสร้างคือ C4H6 และมีคุณสมบัติยับยั้งการทำงานของเอทิลีนโดยจับกับ ethylene receptor การใช้ 1-MCP ในทางการค้ากับผลไม้หลายชนิดในสหรัฐอเมริกาโดยมีชื่อการค้าว่า Smartfresh® ซึ่งจัดจำหน่ายโดยบริษัท AgroFresh และผลิตโดยบริษัท Rohm and Hass (SpringHouse, PA) การใช้สาร1-MCP ในต่างประเทศพบว่า ผลไม้หลายชนิดได้แก่ แอปเปิล น้อยหน่า มะเขือเทศ มะม่วง กล้วย อะโวกราโด ท้อ เนคทาลีน บ๊วย และสาลี่ เป็นต้น สามารถยืดอายุการเก็บรักษาผลไม้ดังกล่าวได้ขึ้นอยู่กับ ระยะเวลาและวิธีการใช้ที่เหมาะสม พันธุกรรม และความบริบูรณ์ของผลิตผล (Blankenship et.al, 2003) นอกจากนี้จากการตรวจสอบความปลอดภัยและความเป็นพิษต่อผู้บริโภคตลอดจนผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมในสหรัฐอเมริกาพบว่า การใช้ 1-MCP ในอัตราที่ต่ำไม่พบความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตโดยทดสอบให้หนูสูดดมสาร 1-MCP จากการรมในภาชนะปิด พบว่า LC50 เท่ากับ 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตรหรือ 1.126 ppm ของสารออกฤทธิ์ และไม่พบการเป็นพิษเฉียบพลัน (Environmental Protection Agency, 2002)

บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

<u>การทดลองที่ 1</u> การสำรวจตำแหน่ง จำนวนและชนิดของชาเมี่ยง

การศึกษาจำนวนชาเมี่ยง จังหวัดสุโขทัย แพร่ และน่าน โดยใช้เครื่องมือชี้พิกัดจากดาวเทียม หรือ GPS (Global Positional System) โดยใช้วิธี

1.1 วิธีสำรวจแบบ point-centered quarter method โดยทำการกำหนดเส้นฐานเพื่อใช้เป็นฐานในการวางแนวสำรวจ การวางแนวสำรวจจะทำตั้งฉากออกไปจากเส้นฐาน กำหนดระยะทางระหว่างแนวสำรวจแต่ละแนวเท่ากับ 50 เมตร และกำหนดระยะทางระหว่างจุดสุ่ม แต่ละจุดเท่ากับ 50 เมตร เมื่อได้จุดสุ่มแล้วสร้างเส้นแนวตัดกันเป็นมุมฉาก เพื่อแบ่งพื้นที่รอบจุดออกเป็น 4 quadrants อาจยึดแนวเข็มทิศเป็นหลัก แล้วทำการวัดระยะจากจุดสุ่มไปยังชาเมี่ยงที่อยู่ใกล้ที่สุดแต่ละ quadrants เพื่อทำการคำนวณหาตำแหน่งและความหนาแน่นของชาเมี่ยง

1.2 วิธีสำรวจแบบ random survey การเดินทางสำรวจพื้นที่ทั่วไปตามวิธีการเดินป่า โดยไม่กำหนดเขตพื้นที่ ในจังหวัดสุโขทัย แพร่ และน่าน

<u>การทดลองที่ 2</u> การจำแนกชนิดของชาเมี่ยง จังหวัดสุโขทัย แพร่ และน่าน

ทำการศึกษาสัณฐานวิทยาของชาเมี่ยง ที่พบในจังหวัดสุโขทัย แพร่ และน่าน จากนั้นนำตัวอย่างแห้ง รูปภาพดิจิตอลและข้อมูลทางสัณฐานวิทยาที่สำรวจพบ มาทำการจัดจำแนกชนิดและตรวจหาชื่อวิทยาศาสตร์ เปรียบเทียบกับตัวอย่างแห้งของสำนักงานหอพรรณไม้

<u>การทดลองที่ 3</u> การศึกษาการจำแนกลักษณะทางนิเวศวิทยาของชาเมี่ยง จังหวัดสุโขทัย แพร่ และน่าน

3.1 ความแตกต่างของสิ่งยึดอาศัยตามธรรมชาติ

3.2 การศึกษาความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาของชาเมี่ยง

นำตัวอย่างชาเมี่ยง ที่สำรวจพบในจังหวัดเชียงรายสุโขทัย แพร่ และน่าน มาศึกษาข้อมูลทางด้านความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาในเชิงปริมาณ โดยดูลักษณะลำต้น ก้าน ใบ ดอก และทำการบันทึกความขนาดความกว้างและความยาว

3.3 ลักษณะสภาพแวดล้อมของชาเมี่ยง

การศึกษาลักษณะสภาพแวดล้อมที่ชาเมี่ยง อาศัยอยู่ทำได้โดยพิจารณาจากความแตกต่างของสังคมพืช และความแตกต่างของความเข้มของแสงบริเวณที่พบ โดยการวัดความเข้มแสงใช้เครื่องมือวัดแสง (Lux-meter)

<u>การทดลองที่ 4</u> ศึกษาลักษณะระยะพัฒนาการของต้นอ่อนชาเมี่ยงในสภาพปลอดเชื้อ

1) นำยอดอ่อนชาเมี่ยงมาล้างด้วยน้ำสะอาด แล้วนำมาฟอกฆ่าเชื้อด้วย Sodium hypochlorite ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ระยะเวลาที่แตกต่างกัน โดยวางแผนการทดลองแบบ factorial in CRD โดยมีปัจจัย 2 ปัจจัย

ปัจจัยที่1 คือ ความเข้มข้นของ Sodium hypochlorite 0, 5. 10 เปอร์เซ็นต์

ปัจจัยที่ 2 คือ ระยะเวลาในการแช่ฟอกฆ่าเชื้อ 0, 5, 10, 15 นาที

~~2) บันทึกผลการทดลอง ได้แก่ อัตราการรอดชีวิต และเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ~~

3) บันทึกการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ ทุกเดือนเป็นเวลา 3 เดือน ได้แก่ ความสูง เส้นผ่านศูนย์กลาง ทรงพุ่ม จำนวนใบ

<u>การทดลองที่ 5</u> ศึกษาผลของฮอร์โมน NAA ร่วมกับ BA ที่มีต่อการเจริญเติบโตของชาเมี่ยงในสภาพปลอดเชื้อ

นำต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้ออายุ 3 เดือน มาเลี้ยงบนสูตรอาหาร สูตร MS (Murashige and Skoog) ที่เติม BA 0, 0.1, 0.5, 1.0 และ 2.0 ppm ร่วมกับ NAA 0, 1, 2, 3 และ 4 ppm วางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD ทำทั้งหมด 10 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ขวด และเมื่อครบ 4 เดือนแล้ว นำต้นอ่อน (seedling) มาล้างวุ้นออกให้หมด จากนั้นชั่งน้ำหนักสดของต้นกล้า วัดความสูงของลำต้นที่ยาวที่สุด นับจำนวนใบ วัดความยาวของรากที่ยาวที่สุด จากนั้นนำข้อมูลที่บันทึกได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และ 99 เปอร์เซ็นต์

<u>การทดลองที่ 6</u> ศึกษาผลของธาตุอาหารต่อการเจริญเติบโตของของชาเมี่ยง

วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำทั้งหมด 10 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ต้น นำต้นอ่อนขนาดความสูง 2-3 เซนติเมตร มาล้างวุ้นออกให้หมด ก่อนนำไปปลูกในกระถางที่มีความอุดมสมบูรณ์ของดินแตกต่างกัน บันทึกอัตราการรอดชีวิตและการเจริญเติบโตทุก 1 เดือน เป็นเวลา 3 เดือน ได้แก่ ความสูงของลำต้น จำนวนใบ ความยาวของราก จากนั้นนำข้อมูลที่บันทึกได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

<u>การทดลองที่ 7</u> **การสกัด DNA ใช้วิธีการดัดแปลงของ Doyle และ Doyle (1990)**

1) นำใบพืชประมาณ 0.5 กรัม บดในโกร่งด้วยไนโตรเจนเหลวให้ละเอียด (คล้ายผงแป้ง) นำมาใส่หลอดขนาด 1.5 ml ประมาณครึ่งหลอด

2) เติม Extraction buffer (3X CTAB buffer) 650 µl นำไป incubate ที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง (ใน water bath)

3) นำมาสกัดด้วย Chloroform : isoamyl (24 : 1) 500 µl ผสมให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบ /นาที เป็นเวลา 15 นาที ย้ายสารละลายตอนบนใส่หลอดใหม่

4) ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย Isopropanol (หรือ absolute ethanol) ปริมาตร 750 µl แช่เย็นไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบ /นาที เป็นเวลา 10 นาที

5) ล้างตะกอนดีเอ็นเอ โดยใช้ 70% ethanol ปริมาตร 500 µl ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบ / นาที เป็นเวลา 5 นาที ประมาณ 2-3 ครั้ง นำตะกอนดีเอ็นเอมาตากให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

6) ละลายดีเอ็นเอใน สารละลาย TE buffer (10mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM EDTA (pH 8.0)) ปริมาตร 300 µl และเติม RNaseA 10 µl

7) ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย 30 µl, 3M Sodium acetate และ 600 µl 95% ethanol ที่แช่เย็น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบ /นาที เป็นเวลา 1 นาที ล้างก้อนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol ปริมาตร 500 µl 2 ถึง 3 ครั้ง ผึ่งให้แห้ง

8) ละลายดีเอ็นเอในสารละลาย TE 50 ul และเติม RNaseA 5 µl เก็บที่ 4oC

<u>**การทดลองที่**</u> <u>8</u> การตรวจสอบปริมาณของดีเอ็นเอ

หาความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่เตรียมไว้โดยนำไปเปรียบเทียบกับ DNA ที่มีความเข้มข้นมาตรฐาน (Lambda DNA standard) โดยนำมาทำอิเล็กโตรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจลความเข้มข้น 0.8% เมื่อได้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอตัวอย่างแล้ว เจือจางดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่น ให้มีความเข้มข้น 100 ng/µl

<u>การทดลองที่ 9</u> **การทำปฏิกิริยา AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) ใช้วิธีการของ VOS และคณะ (1995)**

1.1 Digestion

นำดีเอ็นเอของพืชซึ่งมีความเข้มข้นประมาณ 0.5 µg มาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ EcoRI (5 unit) และ Tru 9I (5 unit), (Tru 9I เป็นเอนไซม์ที่ตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกับ Mse I) ในบัฟเฟอร์ ชนิด A (Borhringer Mannheim) (33 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM KCl และ 0.5 mM DTT) ในปริมาตร 40 µl ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

1.2 Ligation

นำดีเอ็นเอที่ถูกย่อยแล้วมาต่อด้วย adapter ที่มีลำดับเบสตรงกับที่จดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 2 ชนิด (EcoRI – adapter และ Mse I – adapter) โดยการเติมบัฟเฟอร์ 10 µl ที่ประกอบด้วย 5 pmol EcoRI-adapter, 50 pmol Mse I –adapter, 30 mM Tris-HCl pH 7.8 , 10 mM DTT , 1 mM ATP (10Xligase buffer) (Promega) และ 1 unit T4 DNA ligase ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อประมาณ 10 เท่า เก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

1.3 Pre-amplification (PCR I)

นำดีเอ็นเอที่ทำการย่อยและต่อกับ adapter แล้ว และเจือจางลง 10 เท่า ปริมาตร 5 µl นำมาทำการเพิ่มปริมาณ DNA โดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ Primer ที่มี selective nucleotide เบส 1 เบส โดยใช้ primer ด้าน EcoRI และ MseI ปริมาณ 70 นาโนกรัม ในปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย, 50 mM $MgCl_2$, 10x PCR buffer, 2.5mM dNTPs และ Taq DNA polymerase 1 unit ในปริมาตรรวม 50 µl ทำปฏิกิริยาด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (เครื่อง PCR) มีรายละเอียดของอุณหภูมิดังนี้ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 56 องศาเซลเซียส 1 นาที 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 20 รอบ เมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยาเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ 10 เท่า และเก็บที่ –20 องศาเซลเซียส

1.4 Amplification (PCR II)

นำDNA ที่ได้จากขั้นตอน PCR I 3 µl ทำการเพิ่มปริมาณ DNA โดยการคัดเลือกชิ้นที่จะเพิ่มปริมาณด้วย primer ที่เป็นเบสคู่สมกับ adapter แต่มีปลายยื่นจาก adapter ด้วย 3' จำนวน 3 เบส (+ 3 selective nucleotide) ปฏิกิริยาประกอบด้วย EcoRI และ MseI primer ปริมาณ 30 นาโนกรัม, 50 mM $MgCl_2$, 10x PCR buffer, 2.5mM dNTPs และ Taq DNA polymerase 0.4 unit ปริมาตรที่ใช้ 20 µl ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 65 องศาเซลเซียส 30 วินาที โดยการลดอุณหภูมิทุก 1 องศาเซลเซียส จนกระทั่งอุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส (เฉพาะขั้นตอน annealing) 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 34 รอบ ด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ เมื่อเสร็จปฏิกิริยาเติม 10 µl loading dye (95% formamide, 10 mM NaOH, 0.05% Bromophenol Blue และ 0.05% xylene cyanol)

<u>การทดลองที่ 10</u> การตรวจผลปฏิริยา AFLP

นำดีเอ็นเอ 10 µl จาก PCR II ที่เติม loading dye แล้วมาตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณด้วย 1% agarose ใน 0.5x TBE โดยสังเกตจากแถบดีเอ็นเอประมาณแถบสีของ Bromphenol Blue จากนั้นนำมาวิเคราะห์แยกแถบดีเอ็นเอโดยการผ่าน 4.5% denatured polyacrylamide gel electrophoresis โดยใช้ดีเอ็นเอที่ทำให้เป็นเส้นเดี่ยวที่อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส เวลา 3 นาที และลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วโดยแช่บนน้ำแข็งโดยใช้ปริมาตร 5 µl ใช้ 1x TBE เป็นบัฟเฟอร์ กระแสไฟฟ้า 40 วัตต์ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เวลาประมาณ 45 นาที (หรือจนกว่าสี xylene cyanol คือสีที่อยู่ด้านบน จะเคลื่อนลงมาประมาณ 2 ใน 3 ส่วนของเจล) จากนั้นแยกกระจกทั้งสองออกจากกันแล้วนำไปย้อมสีด้วยวิธี Silver staining โดยการเขย่าเบาๆ ใน 10%acetic 20 นาที (เมื่อใช้เสร็จแล้วเก็บ10% acetic ไว้ก่อน) จากนั้นล้างด้วยน้ำเปล่า 3 ครั้งๆละ 2 นาที และเขย่าเบาๆ ในสารละลาย Silver staining (1g Silver nitrate และ 1.5 ml 37% formaldehyde ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร) เป็นเวลา 30 นาที นำมาให้เกิดแถบสีด้วย developer solution (30g Na2Co3 , 1.5 ml 37% formaldehyde, 2 mg Na2S2O3 . 5H2O ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร) ที่แช่เย็น เขย่าจนปรากฏแถบดีเอ็นเอชัดเจน แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วย 10 % acetic acid ในปริมาตรที่เท่ากัน ล้างด้วยน้ำเปล่า 2 นาที ทิ้งไว้ในอากาศจนแห้ง

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. เลือกแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน (polymorphic bands) โดยให้1 แทนแถบที่ปรากฏในตำแหน่ง (loci) นั้นๆ และ 0 แทนตำแหน่งที่ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ

2. นำมาหาค่า Similarity coefficient โดยใช้ค่าสหสัมพันธ์ของ Dice (1945) = 2Nx,y/ Nx+Ny โดยที่ Nxy คือจำนวนแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันระหว่างพันธุ์ที่ x และพันธุ์ที่ y, Nx และ Ny เป็นจำนวนแถบดีเอ็นเอที่มีทั้งหมดในพันธุ์ที่ x และพันธุ์ที่ y

3. จัดกลุ่มโดยวิธี UPGMA และใช้โปรแกรม NTSYS-pc Ver.2.11 (Rohlf, 2000) ในการวิเคราะห์

การทดลองที่ 11 ผลของน้ำที่ใช้ในการล้างชนิดต่างๆ ที่มีผลต่อคุณภาพของชาเมี่ยง

วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) มี 6 ซ้ำๆละ 0.5 กิโลกรัม

ทรีตเมนต์ 1 Control (ไม่ล้างน้ำ)

ทรีตเมนต์ 2 น้ำประปา

ทรีตเมนต์ 3 น้ำบาดาล

ทรีตเมนต์ 4 น้ำที่เติมคลอรีน 10 ppm

ทรีตเมนต์ 5 น้ำที่เติมคลอรีน 100 ppm

ทรีตเมนต์ 6 น้ำที่เติมคลอรีน 1000 ppm

นำมาตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ และบันทึกผลการทดลอง ดังการทดลองที่ 1

การทดลองที่ 12 การศึกษาผลของการใช้อุณหภูมิต่ำเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาชาเมี่ยง

วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) มี 6 ซ้ำๆละ 0.5 กิโลกรัม ที่มีขนาดใกล้เคียงกันและอยู่ในระยะเดียวกัน แบ่งเป็นกรรมวิธีดังต่อไปนี้

ทรีตเมนต์ 1 เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิห้อง)

ทรีตเมนต์ 2 เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส

ทรีตเมนต์ 3 เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส

ทรีตเมนต์ 4 เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส

นำมาตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ และบันทึกผลการทดลอง ดังการทดลองที่ 1

บทที่ 4
ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 การสำรวจตำแหน่ง จำนวนและชนิดของชาเมี่ยง จังหวัดสุโขทัย แพร่ และน่าน

1) การศึกษาจำนวนชาเมี่ยง จังหวัดสุโขทัย แพร่ และน่าน โดยใช้เครื่องมือชี้พิกัดจากดาวเทียม หรือ GPS (Global Positional System) (ตาราง 1)

ตาราง 1 **พื้น**ที่ที่พบ และแหล่งเจริญเติบโตของชาเมี่ยง

พันธุ์	พื้นที่ที่พบ	แหล่งเจริญเติบโต
ชาพื้นเมือง (ขม) ชาพื้นเมือง (ไม่ขม) ชาเบอร์ 12	1) ตำบลภูฟ้า อำเภอบ่อเกลือ จังหวัดน่าน พิกัด : ละติจูต 19; 54; 36.6100, ลองติจูต 101; 14; 44.9799	เจริญเติบโตที่ความสูงระดับ 534.1 เมตรขึ้นไป
ชาพื้นเมือง	2) ตำบลศรีนาป่าน อำเภอเมือง จังหวัดน่าน พิกัด : ละติจูต 19; 54; 36.6100, ลองติจูต 101; 14; 44.9799	เจริญเติบโตที่ความสูงระดับ 523.1 เมตรขึ้นไป

ผลการสำรวจตำแหน่งพื้นที่ลักษณะการเจริญเติบโตของชาเมี่ยงพบว่า พื้นที่และแหล่งเจริญเติบโต ที่สำรวจมีอยู่ 2 แหล่ง คือ 1) ตำบลภูฟ้า อำเภอบ่อเกลือ จังหวัดน่าน พิกัด : ละติจูต 19; 54; 36.6100, ลองติจูต 101; 14; 44.979 2) ตำบลศรีนาป่าน อำเภอเมือง จังหวัดน่าน พิกัด ; ละติจูต 19; 54; 36.6100, ลองติจูต 101; 14; 44.9799 อยู่ที่ความสูงระดับ 500 เมตรขึ้นไป ส่วนจังหวัดสุโขทัยและจังหวัดแพร่ไม่พบแหล่งปลูกชาเมี่ยง เนื่องจากเกษตรกรส่วนใหญ่จะรับใบเมี่ยงสด และใบเมี่ยงนึ่งมาจากจังหวัดน่าน

2) ภาพการสำรวจชาเมี่ยง

ภาพ 1 ลักษณะต้นของชาเมี่ยง

ภาพ 2 ลักษณะผลของชาเมี่ยง

ภาพ 3 ลักษณะใบของชาเมี่ยง

ภาพ 4 ลักษณะใบของชาเมี่ยง

4.2 การศึกษาการจำแนกชนิด และการจำแนกลักษณะทางนิเวศวิทยาของชาเมี่ยง

ทำการศึกษาสัณฐานวิทยาของชาเมี่ยง ที่พบในจังหวัดน่าน จากนั้นนำตัวอย่างแห้ง รูปภาพดิจิตอลและข้อมูลทางสัณฐานวิทยาที่สำรวจพบ มาทำการจัดจำแนกชนิดและตรวจหาชื่อวิทยาศาสตร์ เปรียบเทียบกับตัวอย่างแห้งของสำนักงานหอพรรณไม้ ดังการจัดหมวดหมู่อนุกรมวิธานของชา ต่อไปนี้

Kingdom	Plantae - Planta, plantes, plants, Vegetal
Subkingdom	Tracheobiorita - Vascular Plants
Division	Magnoliophyta - angiosperms, flowering Plants
Class	Magnoliopsida – discots, dicotyledons
Subclass	Dilleniidea
Order	Theales
Family	Theaceae - tea

Genus Camellia L. - camellia
Species Camellia sinensis (L.) Kuntze - tea
Variety Camellia sinensis var. assamica (J. Masters.) Kitam. – Assam tea

ชาเป็นพืชในวงศ์ (family) Theaceae สกุล (genus) Camellia ที่มีมากกว่า 300 ชนิด (species) ชาที่ผลิตทางการค้าส่วนใหญ่มาจาก 2 สายพันธุ์ คือ *Camellia sinensis* var. *sinensis* (Chinese tea) และ *Camellia sinensis* var. *assamica* (Assam tea) สายพันธุ์ที่สำรวจพบ คือ สายพันธุ์ชาอัสสัม มีลักษณะใบชาที่ใหญ่กว่าชาสายพันธุ์จีน เป็นพันธุ์ชาที่เจริญเติบโตได้ดีตามป่า มีร่มไม้ และแสงแดดผ่านได้พอประมาณ ชาอัสสัมส่วนมากมักพบบนเขตพื้นที่สูงหรือบนดอยต่าง ๆ ในเขตจังหวัดภาคเหนือ ต้นชาประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ ที่สำคัญดังนี้

ลำต้น เป็นไม้พุ่มขนาดกลาง-ใหญ่ ผิวลำต้นเรียบ กิ่งอ่อนปกคลุมด้วยขนอ่อน ชาในกลุ่มนี้มีลักษณะเป็นไม้ขนาดใหญ่ ต้นใหญ่สูงประมาณ 6-18 เมตร และมีขนาดใหญ่กว่าชาในกลุ่มชาจีนอย่างเด่นชัด กิ่งที่มีอายุมากจะเปลี่ยนเป็นสีเทา

ใบ มีลักษณะเป็นใบเดี่ยว ปลายใบแหลม การเรียงตัวของใบบนกิ่งเป็นแบบสลับและเวียน (spiral) ใบมีความกว้างประมาณ 3.0-6.0 เซนติเมตร ยาวประมาณ 7.0-16.0 เซนติเมตร แต่อาจพบใบที่มีขนาดใหญ่กว่าที่กล่าว คือใบมีความกว้าง 5.6-7.5 เซนติเมตร ยาวประมาณ 17.0-22.0 เซนติเมตร ขอบใบมีหยักเป็นฟันเลื่อยเด่นชัด จำนวนหยักฟันเลื่อยเฉลี่ยประมาณ 9 หยัก/ความกว้างของใบ 1.0 นิ้ว ส่วนของก้านใบและด้านท้องใบมีขนอ่อนปกคลุม แผ่นใบมีสีเขียวอ่อนถึงสีเขียวเข้ม

ดอก เจริญจากตาบริเวณง่ามใบบนกิ่ง ในแต่ละตาประกอบด้วยตาที่เจริญไปเป็นกิ่งใบอยู่ด้านบนของตา ส่วนใหญ่ดอกออกติดกันเป็นกลุ่ม ช่อละประมาณ 2-4 ดอก/ตา ก้านดอกยาวประมาณ 10.0-12.0 มิลลิเมตร กลีบเลี้ยงมีจำนวน 5-6 กลีบ แต่ละกลีบมีขนาดไม่เท่ากัน มีรูปทรงโค้งมนยาว กลีบดอกติดอยู่กับวง corolla ที่มีลักษณะคล้ายถ้วยหงาย กลีบดอกมีจำนวน 5-6 กลีบ ส่วนโคนกลีบติดกับฐานดอกแคบ ส่วนปลายกลีบบานออก วงเกสรตัวผู้ประกอบด้วยอับละอองเกสรสีเหลืองติดอยู่ที่ส่วนปลายของก้านชูอับละอองเกสรสีขาว ยาวประมาณ 5.0 มิลลิเมตร เกสรตัวเมีย (style) มีลักษณะเป็นก้านกลม ภายในรังไข่แบ่งออกเป็น 1-3 ช่อง ดอกเมื่อบานเต็มที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3.65 เซนติเมตร

ผล เป็นแคปซูล เมื่อผลแก่เต็มที่เปลือกจะแตกออก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2.0-4.0 เซนติเมตร

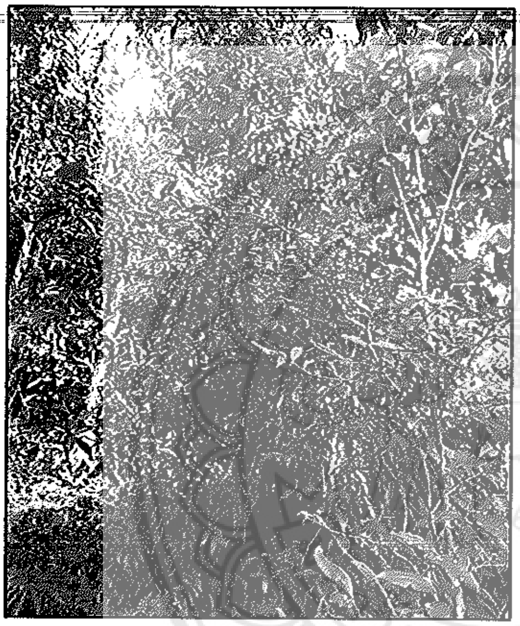
เมล็ด ค่อนข้างกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 11.0-12.0 มิลลิเมตร ผิวของเมล็ดเรียบแข็ง มีสีน้ำตาล หรือ น้ำตาลอมแดง หรือน้ำตาลเข้มเกือบดำ

4.3 ศึกษาลักษณะระยะพัฒนาการของต้นอ่อนชาเมี่ยงในสภาพปลอดเชื้อ

นำยอดอ่อนชาเมี่ยงมาล้างด้วยน้ำสะอาด แล้วนำมาฟอกฆ่าเชื้อด้วย Sodium hypochlorite ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ระยะเวลาที่แตกต่างกัน โดยวางแผนการทดลองแบบ factorial in CRD โดยมีปัจจัย 2 ปัจจัย

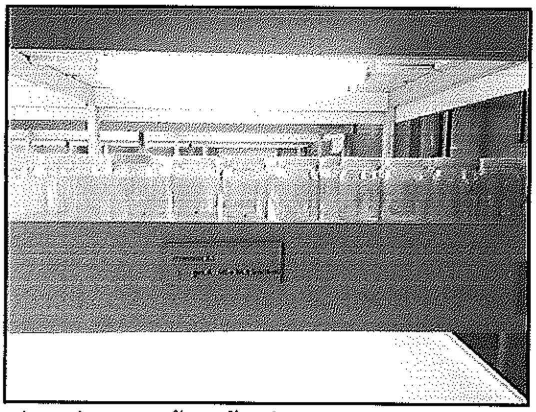
ปัจจัยที่1 คือ ความเข้มข้นของ Sodium hypochlorite 0, 5, 10 เปอร์เซ็นต์

ปัจจัยที่ 2 คือ ระยะเวลาในการแช่ฟอกฆ่าเชื้อ 0, 5, 10, 15 นาที



ภาพ 5 ต้นพันธุ์ชาเมี่ยงสำหรับใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ทำการคัดเลือกต้นชาเมี่ยงสำหรับเป็นต้นพันธุ์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ควรคัดเลือกจากลักษณะที่มีความต้านทานโรคโดยนำส่วนของยอดอ่อนมาล้างทำความสะอาดฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วน เริ่มจากการล้างด้วยน้ำไหล ตัดแต่งเศษวัสดุและเนื้อเยื่อยอดอ่อน ทำการตัดยอดอ่อนให้มีขนาดประมาณ 2 เซนติเมตรควรล้างด้วยความระมัดระวังด้วยน้ำสบู่แล้วล้างด้วยน้ำไหลจนสะอาดฟอกฆ่าเชื้อด้วย 2 % sodium hypochlorite เป็นเวลา 20 นาที ภายใต้สภาวะสุญญากาศ (vacuum conditions) แล้วนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 3 ครั้ง นำตัวอย่างชิ้นส่วนที่มีขนาด 0.2-0.5 เซนติเมตร จากนั้นนำไปเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ



ภาพ 6 ทำการฟอกฆ่าเชื้อยอดชาเมี่ยงเพื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

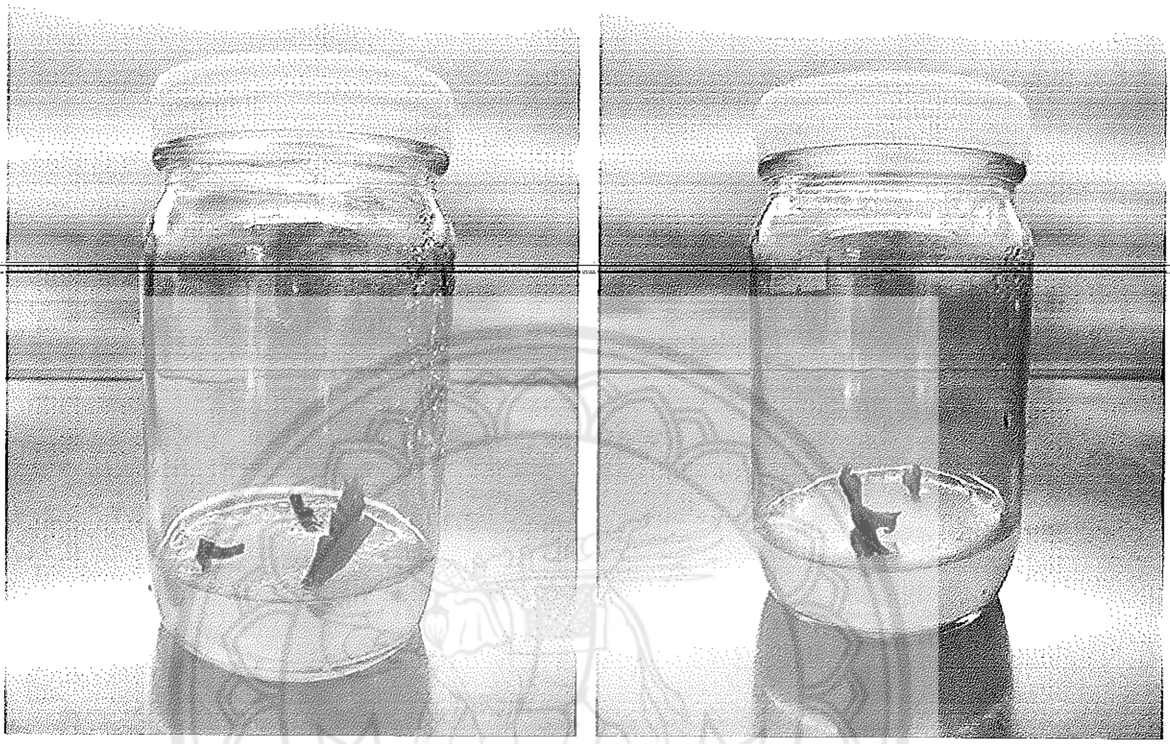
4.4 ศึกษาผลของฮอร์โมน NAA ร่วมกับ BA ที่มีต่อการเจริญเติบโตของชาเมี่ยงในสภาพปลอดเชื้อ

นำต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้ออายุ 3 เดือน มาเลี้ยงบนสูตรอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog) ที่เติม BA 0, 0.1, 0.5, 1.0 และ 2.0 ppm ร่วมกับ NAA 0, 1, 2, 3 และ 4 ppm วางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD ทำทั้งหมด 10 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ขวด และเมื่อครบ 4 เดือนแล้ว นำต้นอ่อน (seedling) มาล้างวุ้นออกให้หมด จากนั้นชั่งน้ำหนักสดของต้นกล้า วัดความสูงของลำต้นที่ยาวที่สุด นับจำนวนใบ วัดความยาวของรากที่ยาวที่สุด จากนั้นนำข้อมูลที่บันทึกได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และ 99 เปอร์เซ็นต์

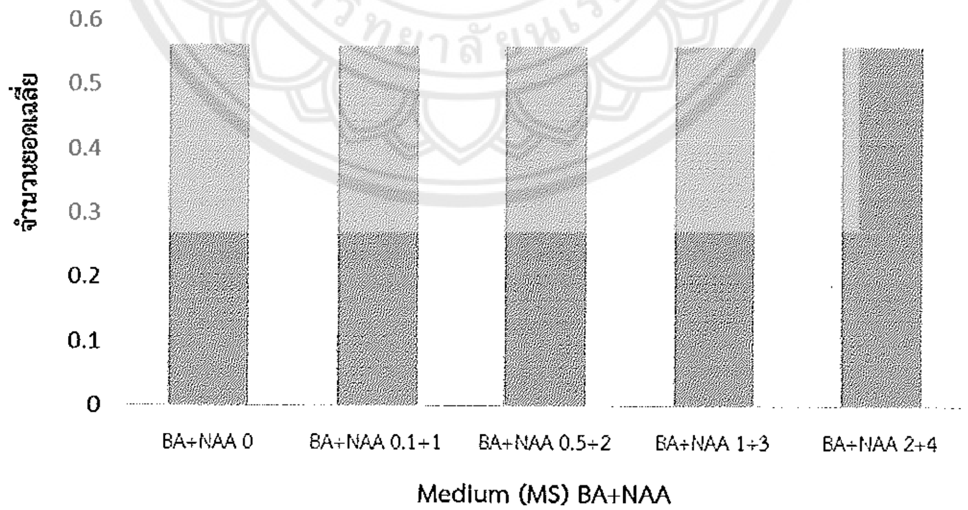
Medium (MS)	Plant growth regulator (mg/l) BA + NAA
A (Control)	0
B	0.1 + 1
C	0.5 + 2
D	1.0 + 3
E	2.0 + 4

ต้นชาเมี่ยงนั้นอยู่ในระหว่างเพาะเลี้ยงอยู่ในห้องปลอดเชื้อเพื่อรอการเจริญเติบโตเพียงพอที่จะนำมาเพิ่มจำนวน และชักนำให้เกิดยอด และพัฒนารากต่อไปโดยเมื่อเจริญเติบโต และปลอดเชื้อเรียบร้อย

แล้วจะย้ายลงอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ส่งผลให้เกิดราก จำนวนต้น เพื่อให้ได้ต้นพันธุ์ชาเมี่ยงที่เจริญเติบโตพร้อมย้ายออกปลูกในธรรมชาติได้



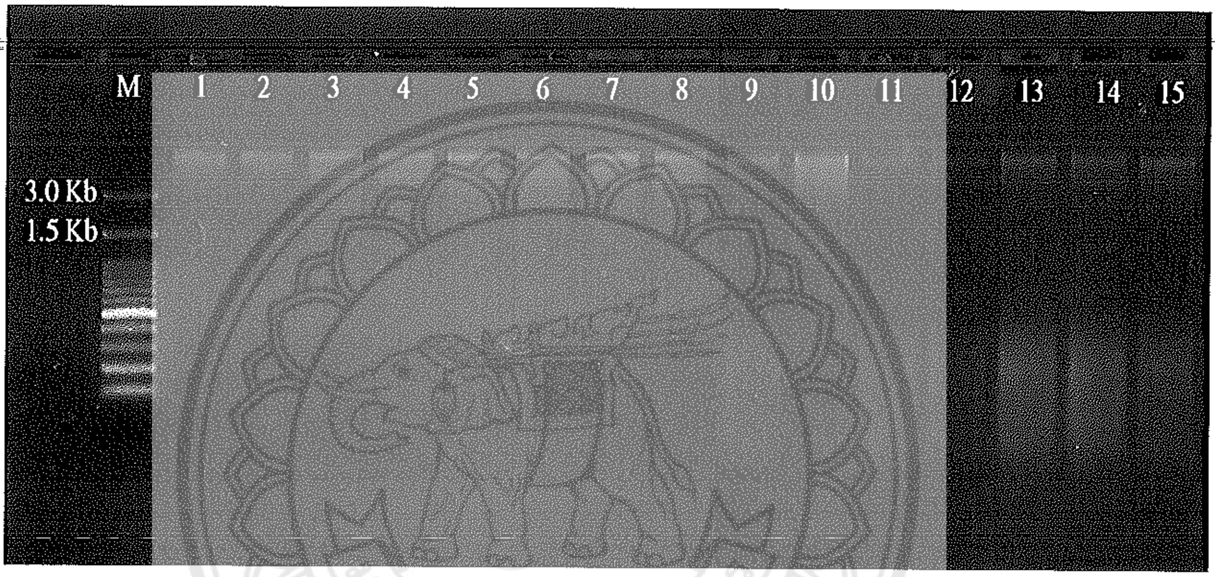
ภาพ 7 ยอดชาเมี่ยงที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพปลอดเชื้อ



จากผลการทดลอง พบว่า ผลของฮอร์โมน NAA ร่วมกับ BA ที่มีต่อการเจริญเติบโตของชาเมี่ยงในสภาพปลอดเชื้อให้ผลไม่แตกต่างจากชุดควบคุม (control)

4.5 การสกัด DNA ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอแบบ Kit และการตรวจสอบผล

ผลการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของชาเมี่ยงที่นำมาศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพจำนวน 15 ตัวอย่าง จีโนมิกดีเอ็นเอมีขนาดใหญ่กว่า 3.0 Kb (ภาพ 8) คุณภาพและปริมาณจีโนมิกดีเอ็นของชาเมี่ยง มีความเหมาะสมสามารถนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอภายในหลอดทดลอง หรือ ปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR) ได้



ภาพ 8 ผลการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของชาเมี่ยงจำนวน 15 ตัวอย่าง

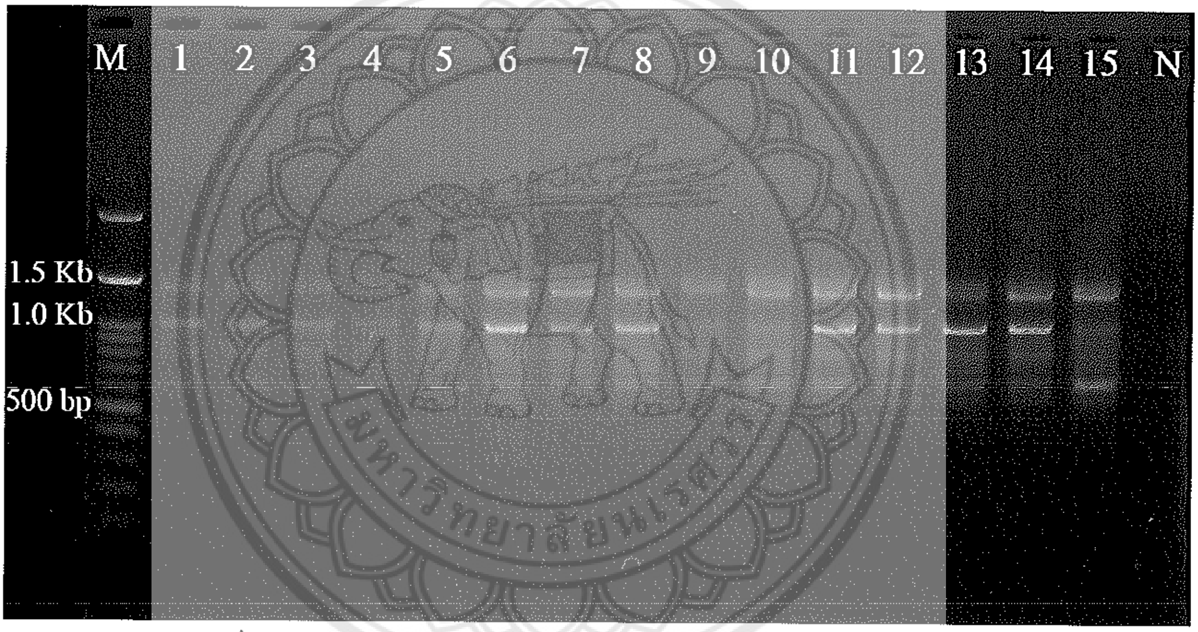
การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบอ่อนของชาเมี่ยงสามารถใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอแบบ Kit ได้ ซึ่งทำให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอค่อนข้างมาก และสะดวกรวดเร็วกว่าวิธีมาตรฐานที่ใช้เวลานาน และมีขั้นตอนซับซ้อน

4.6 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอภายในหลอดทดลองและการตรวจสอบผล

จีโนมิกดีเอ็นเอของชาเมี่ยงจำนวน 15 ตัวอย่าง (ต้น) ถูกนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรส (Polymerase chain reaction; PCR) หรือ พีซีอาร์ เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของตัวอย่างชาเมี่ยงที่นำมาศึกษา ผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) จากไพรเมอร์จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ Scot1, Scot2, Scot3, RAPD-K1 และ RAPD-OPA02 (ตาราง 2) พบว่า ชาเมี่ยงแต่ละต้นมีลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างกัน (ภาพ 9, 10, 11, 12, 13)

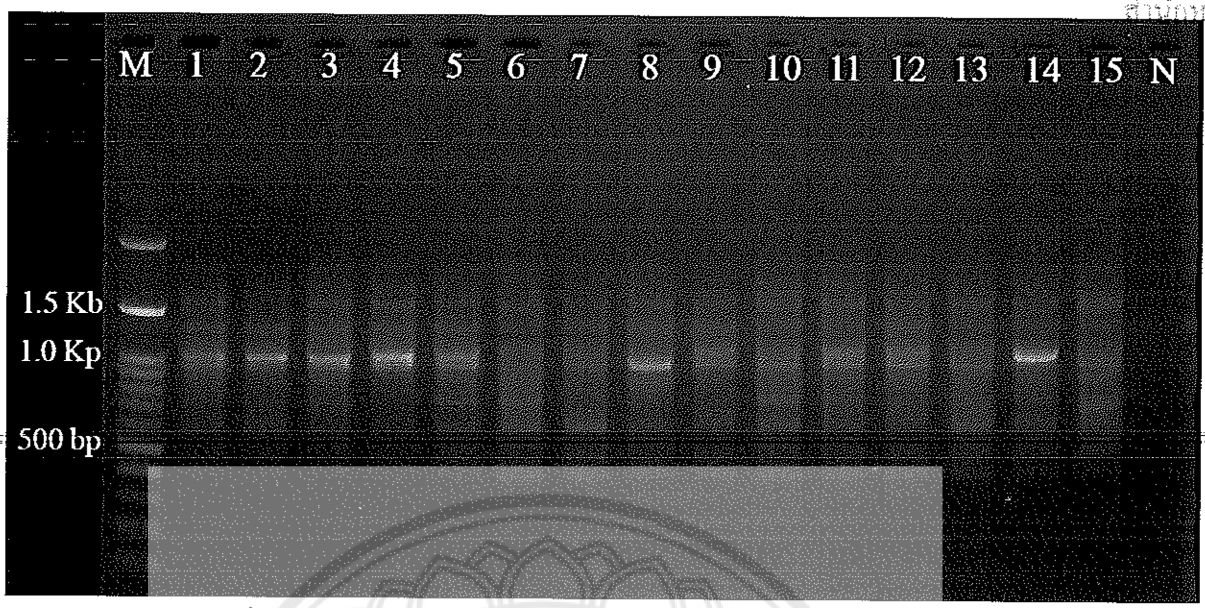
ตาราง 2 ไพรเมอร์จำนวน 5 ชนิด ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอภายในหลอดทดลองโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรส

No.	Name	Sequences (5'-3')
1	SCoT-1	CAACAATGGCTACCACCA
2	SCoT-2	CAACAATGGCTACCACCC
3	SCoT-3	CAACAATGGCTACCACCG
4	RAPD-K1	TGGCGACCTG
5	OPA-02	TGCCGAGCTG



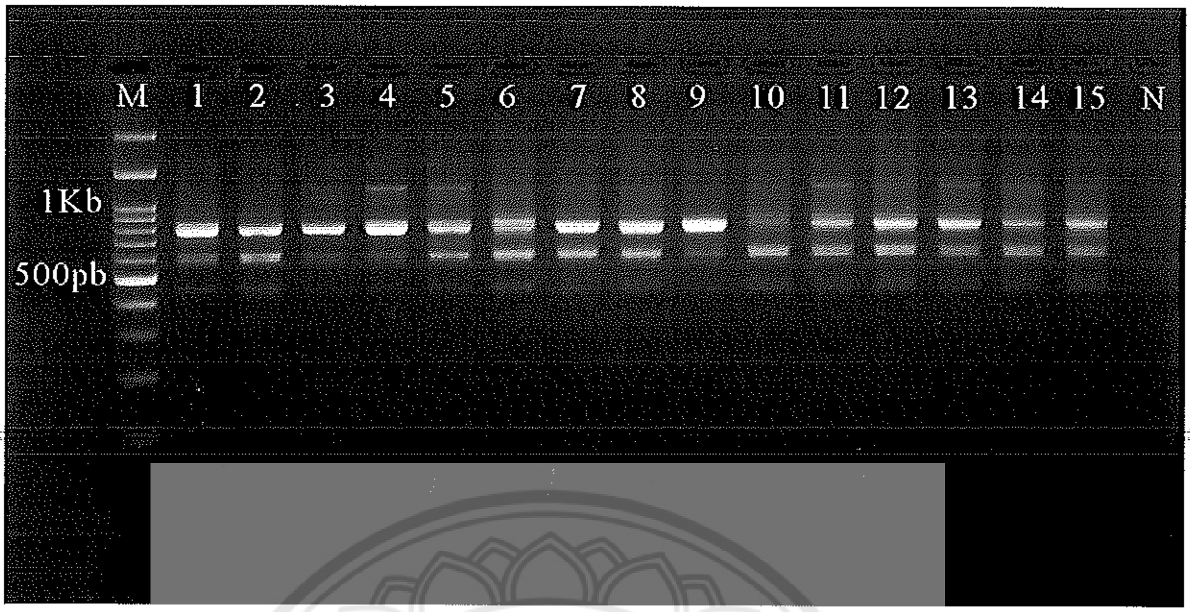
ภาพ 9 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอภายในหลอดทดลอง หรือ ผลผลิตพีซีอาร์ โดยไพรเมอร์ Scot 1

QH 585 .2 2560 05 ต.ค. 2564 1034071 สำนักหอสมุด



ภาพ 10 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอภายในหลอดทดลอง หรือ ผลผลิตพีซีอาร์ โดยไพรเมอร์ Scot 2

ภาพ 11 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอภายในหลอดทดลอง หรือ ผลผลิตพีซีอาร์ โดยไพรเมอร์ Scot 3



ภาพ 12 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอภายในหลอดทดลอง หรือ ผลผลิตพีซีอาร์ โดยไพรเมอร์ RAPD-K1

ภาพ 13 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอภายในหลอดทดลอง หรือ ผลผลิตพีซีอาร์ โดยไพรเมอร์ RAPD-OPA02

การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของชาเมี่ยงด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ เป็นการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตโดยไม่ได้รับอิทธิพลจากสภาพแวดล้อม ซึ่งอาจก่อให้เกิดความแปรปรวนของลักษณะฟีโนไทป์ของสิ่งมีชีวิตได้ ซึ่งลักษณะดีเอ็นเอภายในนี้จะไม่เปลี่ยนไปตามสิ่งแวดล้อมในระยะเวลาอัน

สั้น ทำให้การตรวจวิเคราะห์ด้วยดีเอ็นเอมีความแม่นยำสูงกว่าการตรวจวอเคราะห์จากลักษณะปรากฏภายนอก

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ทั้งหมด 5 ไพรเมอร์ พบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันหลายลักษณะ ล้วนแต่มีเอกลักษณ์เฉพาะตัวทำให้ทราบได้ว่าชาเมี่ยงที่เกษตรกรปลูกอยู่นั้น มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง เนื่องจากเกษตรกรใช้วิธีขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเมล็ด การผสมพันธุ์เกิดขึ้นตามธรรมชาติไม่มีการควบคุม หรือกำหนดคู่ผสมเพื่อคงลักษณะทางพันธุกรรม จึงทำให้มีโอกาสเกิดการผสมข้ามหรือผสมตัวเอง สร้างลักษณะแปลกใหม่ขึ้นมาได้เรื่อย ๆ จนทำให้พบลักษณะของแถบดีเอ็นเอจากผลผลิตพีซีอาร์ที่แตกต่างกันหลายแบบ

บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาสถานการณ์ในปัจจุบันของชาในประเทศไทย พบว่าสายพันธุ์ชาที่ปลูกแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ พันธุ์ชาอัสสัม (*Camellia sinensis* var. *assamica*) และพันธุ์ชาจีน (*Camellia sinensis* var. *sinensis*) กลุ่มพันธ์ชาอัสซัมบางครั้งเรียกว่า ชาพื้นเมือง ชาป่า หรือชาเมี่ยง เจริญได้ดีตามป่าที่มีร่มไม้ ในปี พ.ศ. 2550 ประเทศไทยผลิตใบชาสดทั้งสิ้น 81,074 ตัน ซึ่งใบชาสด 77% นำมาผลิตเป็นชาแห้ง และ 23% นำไปผลิตเป็นเมี่ยง (Sampanvejsobha et al., 2007) โดยชาอัสสัมสามารถนำไปผลิตเป็นชาแห้งชนิดชาเขียว หรือในบางท้องถิ่นมีการนำเอาใบชาอัสสัมมาหมักเป็นเมี่ยง ซึ่งเป็นอาหารเฉพาะของคนไทยในภาคเหนือ (Van der Vossen and Wessel, 2000) ชาเมี่ยงเป็นแหล่งสำคัญของคาเทชิน (catechin) โดยมีปริมาณสูงถึง 30 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง อยู่ในกลุ่มฟีนอลซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชันที่มีคุณภาพสูง และยังพบ theaflavins, thearubigins ในชาเมี่ยงอีกด้วย (Yen and Chen, 1995; Kumamoto and Sonda, 1998; Yang et al., 1998) ในปัจจุบันมีการผลิตชาใบเมี่ยงและผลิตภัณฑ์จากเมี่ยงทางภาคเหนือของประเทศไทยเท่านั้น จากการศึกษาจำนวนชาเมี่ยง จังหวัดสุโขทัย แพร่ และน่าน โดยใช้เครื่องมือชี้พิกัดจากดาวเทียมหรือ GPS (Global Positional System) โดยใช้วิธีสำรวจแบบ random survey การเดินทางสำรวจพื้นที่ทั่วไปตามวิธีการเดิน โดยไม่กำหนดเขตพื้นที่ พบพื้นที่และแหล่งเจริญเติบโต 2 แหล่ง คือ 1) ตำบลภูฟ้า อำเภอบ่อเกลือ จังหวัดน่าน พิกัด : ละติจูต 19; 54; 36.6100, ลองติจูต 101; 14; 44.979 2) ตำบลศรีนาป่าน อำเภอเมือง จังหวัดน่าน พิกัด ; ละติจูต 19; 54; 36.6100, ลองติจูต 101; 14; 44.9799 อยู่ที่ความสูงระดับ 500 เมตรขึ้นไป ส่วนจังหวัดสุโขทัย และจังหวัดแพร่ไม่พบแหล่งปลูกชาเมี่ยง เนื่องจากเกษตรกรส่วนใหญ่จะรับใบเมี่ยงสด และใบเมี่ยงนึ่งมาจากจังหวัดน่าน

การศึกษาสัณฐานวิทยาของชาเมี่ยง ที่พบในจังหวัดน่าน จากนั้นนำตัวอย่างแห้ง รูปภาพดิจิตอลและข้อมูลทางสัณฐานวิทยาที่สำรวจพบ มาทำการจัดจำแนกชนิดและตรวจหาชื่อวิทยาศาสตร์ เปรียบเทียบกับตัวอย่างแห้งของสำนักงานหอพรรณไม้ พบว่า ชาเป็นพืชในวงศ์ (family) Theaceae สกุล (genus) Camellia ที่มีมากกกว่า 300 ชนิด (species) ชาที่ผลิตทางการค้าส่วนใหญ่มาจาก 2 สายพันธุ์ คือ *Camellia sinensis* var. *sinensis* (Chinese tea) และ *Camellia sinensis* var. *assamica* (Assam tea) สายพันธุ์ที่สำรวจพบ คือ สายพันธุ์ชาอัสสัม มีลักษณะใบชาที่ใหญ่กว่าชาสายพันธุ์จีน เป็นพันธุ์ชาที่เจริญเติบโตได้ดีตามป่า มีร่มไม้ และแสงแดดผ่านได้พอประมาณ ชาอัสสัมส่วนมากมักพบบนเขตพื้นที่สูงหรือบนดอยต่าง ๆ ในเขตจังหวัดภาคเหนือ ต้นชาประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ ที่สำคัญดังนี้

ลำต้น เป็นไม้พุ่มขนาดกลาง-ใหญ่ ผิวลำต้นเรียบ กิ่งอ่อนปกคลุมด้วยขนอ่อน ชาในกลุ่มนี้มีลักษณะเป็นไม้ขนาดใหญ่ ต้นใหญ่สูงประมาณ 6-18 เมตร และมีขนาดใหญ่กว่าชาในกลุ่มชาจีนอย่างเด่นชัด กิ่งที่มีอายุมากจะเปลี่ยนเป็นสีเทา

ใบ มีลักษณะเป็นใบเดี่ยว ปลายใบแหลม การเรียงตัวของใบบนกิ่งเป็นแบบสลับและเวียน (spiral) ใบมีความกว้างประมาณ 3.0-6.0 เซนติเมตร ยาวประมาณ 7.0-16.0 เซนติเมตร แต่อาจพบใบที่มีขนาดใหญ่กว่าที่กล่าว คือใบมีความกว้าง 5.6-7.5 เซนติเมตร ยาวประมาณ 17.0-22.0 เซนติเมตร ขอบใบมีหยักเป็นฟันเลื่อยเด่นชัด จำนวนหยักฟันเลื่อยเฉลี่ยประมาณ 9 หยัก/ความกว้างของใบ 1.0 นิ้ว ส่วนของก้านใบและด้านท้องใบมีขนอ่อนปกคลุม แผ่นใบมีสีเขียวอ่อนถึงสีเขียวเข้ม

ดอก เจริญจากตาบริเวณง่ามใบบนกิ่ง ในแต่ละตาประกอบด้วยตาที่เจริญไปเป็นกิ่งใบอยู่ด้านบนของตา ส่วนใหญ่ดอกออกติดกันเป็นกลุ่ม ช่อละประมาณ 2-4 ดอก/ตา ก้านดอกยาวประมาณ 10.0-12.0 มิลลิเมตร กลีบเลี้ยงมีจำนวน 5-6 กลีบ แต่ละกลีบมีขนาดไม่เท่ากัน มีรูปทรงโค้งมนยาว กลีบดอกติดอยู่กับวง corolla ที่มีลักษณะคล้ายถ้วยหงาย กลีบดอกมีจำนวน 5-6 กลีบ ส่วนโคนกลีบติดกับฐานดอกแคบ ส่วนปลายกลีบบานออก วงเกสรตัวผู้ประกอบด้วยอับละอองเกสรสีเหลืองติดอยู่ที่ส่วนปลายของก้านชูอับละอองเกสรสีขาว ยาวประมาณ 5.0 มิลลิเมตร เกสรตัวเมีย (style) มีลักษณะเป็นก้านกลม ภายในรังไข่แบ่งออกเป็น 1-3 ช่อง ดอกเมื่อบานเต็มที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3.65 เซนติเมตร

ผล เป็นแคปซูล เมื่อผลแก่เต็มที่เปลือกจะแตกออก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2.0-4.0 เซนติเมตร

เมล็ด ค่อนข้างกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 11.0-12.0 มิลลิเมตร ผิวของเมล็ดเรียบแข็ง มีสีน้ำตาล หรือ น้ำตาลอมแดง หรือน้ำตาลเข้มเกือบดำ

การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของชาเมี่ยงด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ เป็นการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตโดยไม่ได้รับอิทธิผลจากสภาพแวดล้อม ซึ่งอาจก่อให้เกิดความแปรปรวนของลักษณะฟีโนไทป์ของสิ่งมีชีวิตได้ ซึ่งลักษณะดีเอ็นเอภายในนี้จะไม่เปลี่ยนไปตามสิ่งแวดล้อมในระยะเวลาอันสั้น ทำให้การตรวจวิเคราะห์ด้วยดีเอ็นเอมีความแม่นยำสูงกว่าการตรวจวอเคราะห์จากลักษณะปรากฏภายนอก

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ทั้งหมด 5 ไพรเมอร์ พบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันหลายลักษณะ ล้วนแต่มีเอกลักษณ์เฉพาะตัวทำให้ทราบได้ว่าชาเมี่ยงที่เกษตรกรปลูกอยู่นั้น มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง เนื่องจากเกษตรกรใช้วิธีขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเมล็ด การผสมพันธุ์เกิดขึ้นตามธรรมชาติไม่มีการควบคุม หรือกำหนดคู่ผสมเพื่อคงลักษณะทางพันธุกรรม จึงทำให้มีโอกาสเกิดการผสมข้ามหรือผสมตัวเอง สร้างลักษณะแปลกใหม่ขึ้นมาได้เรื่อย ๆ จนทำให้พบลักษณะของแถบดีเอ็นเอจากผลผลิตพีซีอาร์ที่แตกต่างกันหลายแบบ

จากการลงพื้นที่แปลงปลูกชาเมี่ยง พบว่า เกษตรกรมักปลูกชาเมี่ยงหลายสายพันธุ์ในแปลงเดียวกัน อาจทำให้เกิดการผสมข้ามสายพันธุ์หรือผสมข้ามต้นที่อยู่ในบริเวณใกล้เคียงกันก่อให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรม การผสมข้ามที่เกิดขึ้นเป็นข้อดีในแง่การปรับปรุงพันธุ์ ทำให้เกิดลักษณะทางกายภาพ ขนาด และลักษณะใบที่แตกต่างกันออกไป รวมทั้งให้รสชาติของน้ำชาที่เป็นเอกลักษณ์แตกต่างกันด้วย แต่ในทางการอนุรักษ์สายพันธุ์แล้ว เกษตรกรควรรักษาสายพันธุ์แท้หรือสายพันธุ์บริสุทธิ์ไว้เป็นแหล่งพันธุกรรมจำนวนหนึ่ง เพื่อใช้ประโยชน์เป็นต้นพ่อแม่พันธุ์เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ และเพื่อการอนุรักษ์พันธุ์พืช

มหาวิทยาลัยนเรศวร

บรรณานุกรม

จริงแท้ ศิริพานิช. 2558. สรีรวิทยาและเทคโนโลยีการเก็บเกี่ยวผักและผลไม้. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม. 369 หน้า.

ธีรพงษ์ เทพกรณ์. 2545. ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับชาในประเทศไทย. [ระบบออนไลน์].แหล่งที่มา : www.mfu.ac.th. (7 สิงหาคม 2558).

ธีรพงษ์ เทพกรณ์. 2555. ชา: กระบวนการผลิต และองค์ประกอบทางเคมีจากการหมัก. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา. 17(2): 189-196.

ศรีวัฒนา ทรงจิตสมบูรณ์. 2548. สารต้านอนุมูลอิสระ. สำนักพิมพ์หมอชาวบ้าน. 10-22 หน้า.

ศูนย์ศึกษาและพัฒนาวนศาสตร์ชุมชนที่ 2 (เชียงราย). 2553. เมี่ยง ภูมิปัญญาคนห้วยน่าน.

สายลม สัมพนธ์เวชโสภา และคณะ. 2550. การศึกษาสถานภาพปัจจุบันของชาในประเทศไทย. ผลงานวิจัย. มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง. เชียงราย.

สายลม สัมพันธ์เวชโสภา และคณะ. 2551. การศึกษาสถานภาพปัจจุบันของชาไทย. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย.

สุรัติวดี ภาคอุทัย. 2551. โครงการวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์สารออกฤทธิ์เฉพาะทางจากพืชตระกูล *Zanthoxylum* ชาเมี่ยง และตะไคร้ต้น. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. (2545). จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี.กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Ajila, C. M., Leelavathi, K. and Prasada Rao, U.J.S. 2010. Mango peel power: A potential source of antioxidant and dietary fiber in macaroni preparations. Innovat. Food Sci. and Emerging Tech. 11:219-224.

Alexandra H. Smith and Roderick I. Mackie. 2004. Effect of Condensed Tannins on Bacterial Diversity and Metabolic Activity in the Rat Gastrointestinal Tract. APPL ENVIRON MICROB. 70(2): 1101-1115.

Ananingsih ,V.K. Sharma, A. and Zhou, W. 2011. Green tea Catechins during food processing and storage : A review on stability and detection. Food Research International. 50: 469–479

Antonio Carraturo, Katia Raieta, Idolo Tedesco, Jinwoong Kim, and Gian Luigi Russo. 2014. Antibacterial Activity of Phenolic Compounds Derived from Ginkgo

biloba Sarcotestas against Food-Borne Pathogens. British Microbiology Research Journal. 4(1): 18-27.

A.O.A.C. 2000. Official Methods of Analysis of the Association of Official Chemist. The Association of Official Analytical Chemists. Washington, D.C.

Austin, P.R., C.J. Brine, J.E. Castle and J.P. Zikakis. 1981. Chitin: New facets of research. Science. 212: 749-755.

Benzie, I.F.F. and Strain, J.J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. Analytical Biochemistry, 239: 70-76.

Blankenship, S.M. and John M.D. 2003. 1-methylcyclopropene : a review Postharvest Biology and Technology (28) 1-25.

Chu, D. C. and Juneja, L. R. 1997. General chemical composition of green tea and its infusion. In T. Yamamoto, L. R. Juneja, D. C. Chu, & K. Mujo (Eds.), Chemistry and applications of green tea (pp. 13–22). New York: CRC Press.

Doss A., H. Mohammed Mubarack and R. Dhanabalan. 2009. Antibacterial activity of tannins from the leaves of Solanum trilobatum Linn. Indian J Sci Technol. 2(2): 41-43.

Environmental Protection Agency. 2002. Federal Register, 2002. Vol. 67 (144) 48796-48800.

Haslam, E. 2003. Thoughts on thearubigins. Phytochemistry, 64; 61-73.

Heim, K. E., Tagliaferro, A. R. and Bobilya, D. J. 2002. Flavonoid Antioxidants: Chemistry, Metabolism and Structure-activity Relationships. The Journal of Nutritional Biochemistry 13: 572–584.

Hisanori Akiyama, Kazuyasu Fujii, Osamu Yamasaki, Takashi Oono, and Keiji Iwatsuki. 2001. Antibacterial action of several tannins against Staphylococcus aureus. J ANTIMICROB CHEMOTH. 48: 487-491.

Huang, Y. Xu, J. and Hu, Q. 2005. Effect of Selenium on Preservation Quality of Green Tea during Autumn Tea Processing Season, Journal of the Science Food and Agriculture. 53: 7444-7447.

Jantan, L., and Z.M. Zaki. (1998). Development of environment-friendly insect repellents from the leaf oils of selected Malaysian plants. J. Nature Biotechnology, 23, 432-433.

KEW Royal Botanical Gardens. 2557. Herbarium Catalogue. Retrieved on 20th April 2014. From http://apps.kew.org/herbcat/getHome PageResults.do?homePage SearchText=Kadsura + verrucosa

Kim T.J., Silva J.L., Kim M.K., Jung Y.S.. 2010. Enhanced antioxidant capacity and antimicrobial activity of tannic acid by thermal processing. FOOD CHEM. 118: 740-746.

Komes, D. Horzic, D. Belscak, A. Ganic, K. and Vulic, I. 2010. Green tea preparation and its influence on the content of bioactive compounds. Food Research International. 43: 167-176.

Kumamoto, M. and Sonda, T. 1998. Evaluation of the Antioxidative Activity of Tea by an Oxygen Electrode Method. Bioscience Biotechnology Biochemistry. 62: 175-177.

Leong, L. P. and Shui, G. 2002. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. Food Chemistry. 76: 69-75.

Lin, J.K. Chen, P.C. Hö, C.T. and Lin-Shiau, S.Y. 2000. The way of tea: the sublime art of oriental tea drinking. Barron's Educational Series, Inc. New York.

Lecto, K. and Saunders, R.M.K. 1935. *Kadsura ananosma* Kerr, Kew Bull. 1936: 34 (1936). T: Siam [Thailand]: Thanon Thong Chai Range, west-southwest of Chiang Mai, Mê Ka Pak drainage, Doi Ang Ka (Doi Inthanon), 10 Apr. 1935, H.B.G.Garrett 940; Syst. Bot. Monogr. 54: 41 (1998); isolecto: A, E, K, L.

Lin S. H., Darah I., and Jain K. 2006. Antimicrobial activities of Tannins Extracted from *Rhizophora apiculata* Barks. J TROP FOR SCI. 18(1): 59-65.

Liu, J. -S. and Li, L. 1995a. Schisantherins P and Q, Two Lignans from Kadsura coccinea. Phytochemistry 38:1009–1011.

Liu, J. -S. and Li, L. 1995b. Kadsulignans L–N, three dibenzocyclooctadiene lignans from Kadsura coccinea. Phytochemistry 38: 241–245.

Meigy Nelce Mailoa, Meta Mahendradatta, Amran Laga, and Natsri Djide. 2014. Antimicrobial Activities Of Tannins Extract From Guava Leaves (*Psidium Guajava* L) On Pathogens Microbial. IJSTR. 3(1): 236-241

Min, B. R., Pinchak, W. E.*, Merkel, R., Walker, S., Tomita, G. and Anderson, R. C. 2008. Comparative antimicrobial activity of tannin extracts from perennial plants on mastitis pathogens. SCI RES ESSAYS. 3(2): 66-73.

Muntha K. Reddy, Sashi K. Gupta, Melissa R. Jacob, Shabana I. Khan, and Daneel Ferreira. 2007. Antioxidant, Antimalarial and Antimicrobial Activities of Tannin-Rich Fractions, Ellagitannins and Phenolic Acids from *Punica granatum* L. Planta Med. 73: 461-467.

Nancy E. Hernandez, M.L. Tereschuk, L.R. Abdala. 2000. Antimicrobial activity of flavonoids in medicinal plants from Tafí del Valle (Tucumán, Argentina). J ETHNOPHARMACOL. 73: 317-322.

Ozçelik B., D. Deliorman Orhan, S. Ozgen, F. Ergun. 2008. Antimicrobial Activity of Flavonoids against Extended-Spectrum-Lactamase (ESL)-Producing Klebsiella pneumonia. TROP J PHARM RES., 7(4): 1151-1157.

Sevil ALBAYRAK, Ahmet AKSOY, Osman SAGDIC, Umit BUDAK. 2010. Phenolic compounds and antioxidant and antimicrobial properties of Helichrysum species collected from eastern Anatolia, Turkey. Turk J Biol. 34: 463-473.

Silvia Helena Taleb-Contini, Marcos Jose Salvador, Evandro Watanabe, Izabel Yoko Ito, and Dioneia Camilo Rodrigues de Oliveira. 2003. Antimicrobial activity of flavonoids and steroids isolated from two Chromolaena species. BRAZ. J PHARM SCI. 39(4): 403-408.

Sroka, Z. and Cisowski, W. 2003. Hydrogen Peroxide Scavenging, Antioxidant and Anti-radical Activity of Some Phenolic Acids. Food and Chemical Toxicology 41: 753–758. Sun, J., Shi J., Jiang, Y.,

Suraya Sulaiman, Darah Ibrahim, Jain Kassim, and Lim Sheh-Hong. 2011. Antimicrobial and antioxidant activities of condensed tannin from *Rhizophora apiculata* barks. J. Chem. Pharm. Res. 3(4): 436-444.

Perva-Uzunalic, A. Skerget, M. Kneza, Z. Weinreich, B. Otto F. and Gruner, S. 2006. Extraction of active ingredients from green tea (*Camellia sinensis*): Extraction efficiency of major catechins and caffeine. Journal of Food Chemistry. 96: 597-605.

Roberta, R. Nicoletta, P. and Anna P. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free radical biology and medicine. 26(-) : 1231–1237.

Ronald, LP. Xianli, W. and Karen, S. 2005. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. Journal of agricultural and food chemistry. 53: 4290-4302.

Simic, M. G. and Taylor, K.A. 1988. Intiduction to peroxidation and antioxidation mechanisms. Basic Life Science. 49:1-10.

Tang, FY. and Meydani, M. 2001. Green tea catechins and vitamin E inhibit angiogenesis of human microvascular endothelial cells through suppression of IL-8 production. Nutr Cancer. 41: 119–125.

Tawatsin, A., Wratten, S.D., Scott, R., Thavara, V. and Techaamrongsin, Y. (2001). Repellency of volatile oils from plant against three mosquito vectors. J. ofVector Ecology, 26(1), 76-82.

Wills, R.H.H., T.H. Lee, D. Graham, W.B. McGlasson and E.G. Hall. 1981. Postharvest:An Introduction to the Physiology and Handling of Fruit and Vegetables. N.S.W.Univ. Press, New South Wales. 161 p.

Yamazaki T. 2007. The cerebellum as a liquid state machine. Neural Netw. 20: 290–297.

Yang, C. Yang, G.Y. Landau, J.M. Kim, S. and Liao, J. 1998. Tea and Tea Polyphenols Inhibit Cell Hyperproliferation, Lung Tumorigenesis and Tumor Progression. Experimental Lung Research. 24: 629-639.

Yen, G.C. and Chen, H.Y. 1995. Antioxidant Activity of Various Tea Extracts in Relation to Their Antimutagenicity. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 43: 27-32.

Vinson, J. and Dabbagh, Y.A. 1998. Tea phenols: Antioxidant effectiveness of teas, tea components, tea fractions and their binding with lipoproteins. Nutr. Res. 18: 1067-75

Van der Vossen, H.A.M. and M. Wessel. 2000. Plant Resources of South-East Asia No. 16 : Stimulants. PROSEA Foundation Indonesia. 201 p.

Zhen, Y. Chen, Z. Chen, S. and Chen, M. 2002. Tea : Bioactivity and Therapeutic Potential. London : Tayler & Francis.

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์โครงการ

โครงการ การวิจัยและพัฒนาการผลิตชาใบเมี่ยงอย่างยั่งยืน

Research and development on sustainable Miang tea
(*Camellia sinensis* var. *assamica*) production.

คณะผู้วิจัย สังกัด

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุญส่ง แสงอ่อน[1]
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พีระศักดิ์ ฉายประสาท[2]
นายพุทธพงษ์ สร้อยเพชรเกษม[2]

[1] ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร
คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติ และสิ่งแวดล้อม
มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก
[2] ภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร
คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติ และสิ่งแวดล้อม
มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

สนับสนุนโดย
งบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยนเรศวร
ประจำปีงบประมาณ 2560

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

ชาอัสสัม (*Camellia sinensis* var. *assamica*) คือ ชาพื้นเมืองที่ขึ้นตามป่า ลักษณะเป็นลำต้นเดี่ยว สูงประมาณ 6-18 เมตร มีใบใหญ่ เจริญเติบโตได้เร็ว เป็นไม้ยืนต้นขนาดใหญ่ (Van der Vossen and Wessel, 2000) องค์ประกอบที่สำคัญในชาประกอบด้วยสารโพลีฟีนอล (polyphenol) ร้อยละ 20-35 ซึ่งจะมีปริมาณลดลงเมื่อใบมีอายุมากขึ้น (Chu and Juneja, 1999) เป็นผลิตภัณฑ์ท้องถิ่นทางภาคเหนือของประเทศไทยหลายจังหวัด ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ จังหวัดเชียงราย จังหวัดน่าน จังหวัดแพร่ และจังหวัดอุตรดิตถ์ ลักษณะทั่วไปเป็นใบเดี่ยว ปลายแหลม ใบมีความกว้างประมาฯ 17-22 เซนติเมตร มีขั้นตอนโดยการนำใบชาสดมามัดเป็นกำ นึ่งแล้วหมักใส่เกลือและทิ้งไว้จนใบชาเปลี่ยนสภาพเป็นสีเหลือง เมื่อใบยุ่ย จึงจะสามารถนำบริโภคได้ นิยมใช้เป็นของขบเคี้ยวหรืออมเป็นของว่างระหว่างการทำงาน หรือชงดื่มกับน้ำร้อน ช่วยผ่อนคลายความเหน็ดเหนื่อย ปัจจุบันมีอยู่หลายชนิด เช่น เมี่ยงหวาน เมี่ยงเค็ม เมี่ยงหมี่ เมี่ยงขิง เมี่ยงใส่กระเทียมดอง ชาเมี่ยงเป็นแหล่งสำคัญของคาเทชิน (catechin) โดยมีปริมาณสูงถึง 30 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง อยู่ในกลุ่มฟีนอลซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชันที่มีคุณภาพสูง และยังพบ theaflavins, thearubigins ในชาเมี่ยงอีกด้วย (สุรัติวดี ภาคอุทัย, 2551) คาเชทิน (catechin) ในชานั้นพบว่าเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ที่ดีกว่าวิตามิน C, E, tocopherols และ β-carotene (Tang and Meydani, 2001) โดยพบว่าสารสกัดคาเทชิน (catechin) บริสุทธิ์ มีคุณสมบัติในอนุมูลอิสระได้ไม่ดีเท่ากับ crude extract ของชา (Vinson and Dabbagh, 1998) Lin และคณะ (2000) สารโพลีฟีนอลโดยเฉพาะสารคาเทชิน (catechin) มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ (antioxidative) ต้านจุลชีพ (antibacterial) และ ลดอาการภูมิแพ้ (antiallergic activities) (Yen and Chen, 1995; Kumamoto and Sonda, 1998; Yang, 1998) นอกจากนี้ยังมีรายงานตรวจพบ Lactic acid bacteria เช่น *pediococcus pentosaceus* และ Lactobacillus plantarum และ *Lactobacillus* sp. จากเมี่ยง (ใบชาหมัก) และอาหารหมักดองของไทย (Tanasupawat S. and Daengsubha W., 1983 ; Tanasupawat S. at al,1992) ซึ่งเชื้อ Lactic acid bacteria บางชนิดมีคุณสมบัติเป็นเชื้อ probiotic ซึ่งมีผลดีต่อสุขภาพของผู้บริโภคหลายประการ และยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ (Jay, Loessner and Golden, 2005) เชื้อบางสายพันธุ์สร้างเมือกที่สามารถนำไปประยุกต์และผลิตใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้ (Smitinont et al.,1999) แต่ไม่มีงานวิจัยที่ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์ probiotic และจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญระหว่างการหมักเมี่ยง หากดำเนินการตรวจและพบจุลินทรีย์ probiotic ในผลิตภัณฑ์เมี่ยงจะทำให้ผลิตภัณฑ์เมี่ยง

เป็นที่ต้องการของผู้บริโภค ทำให้เกิดผลดีต่อการพัฒนาการผลิตเมี่ยงเชิงการค้าในระยะยาว ส่งผลให้เกษตรกรมีรายได้เพิ่มมากขึ้นและพัฒนาสู่หนึ่งตำบลหนึ่งผลิตภัณฑ์ (OTOP) ที่มีคุณภาพอย่างยั่งยืนต่อไป

Good Manufacturing Practice (GMP) หมายถึง หลักเกณฑ์วิธีการที่ดีในการผลิตอาหารเป็นเกณฑ์หรือข้อกำหนดขั้นพื้นฐานที่จำเป็นในการผลิตและควบคุมเพื่อให้ผู้ผลิตปฏิบัติตามและทำให้สามารถผลิตอาหารได้อย่างปลอดภัย โดยเน้นการป้องกันและขจัดความเสี่ยงที่อาจจะทำให้อาหารเป็นพิษเป็นอันตรายหรือเกิดความไม่ปลอดภัยแก่ผู้บริโภค GMP มี 2 ประเภท คือ GMP สุขลักษณะทั่วไป หรือ General GMP เป็นหลักเกณฑ์ที่นำไปใช้ปฏิบัติสำหรับอาหารทุกประเภท และ GMP เฉพาะผลิตภัณฑ์ หรือ Specific GMP เป็นข้อกำหนดที่เพิ่มเติมจาก GMP ทั่วไปเพื่อมุ่งเน้นในเรื่องความเสี่ยง และความปลอดภัยของแต่ละผลิตภัณฑ์อาหารเฉพาะมากยิ่งขึ้น ซึ่งโดยหลักการของ GMP จะครอบคลุมตั้งแต่สถานที่ตั้งของสถานประกอบการ โครงสร้างอาคารระบบการผลิตที่ดีมีความปลอดภัย และมีคุณภาพได้มาตรฐานทุกขั้นตอน ได้แก่ เริ่มต้นวางแผนการผลิต ระบบควบคุมตั้งแต่วัตถุดิบ ระหว่างการผลิต ผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป การจัดเก็บ การควบคุมคุณภาพและการขนส่งจนถึงผู้บริโภค มีระบบบันทึกข้อมูล ตรวจสอบและติดตามผลคุณภาพผลิตภัณฑ์รวมถึงระบบการจัดการที่ดีในเรื่องสุขอนามัย (Sanitation และ Hygiene) เพื่อให้ผลิตภัณฑ์ขั้นสุดท้ายมีคุณภาพและความปลอดภัยเป็นที่มั่นใจเมื่อถึงมือผู้บริโภค ทั้งนี้ GMP ยังเป็นระบบประกันคุณภาพขั้นพื้นฐานก่อนที่จะพัฒนาไปสู่ระบบประกันคุณภาพอื่นๆ

ในปัจจุบันการผลิตชาใบเมี่ยงดำเนินการผลิตตามวิธีการแบบดั้งเดิม ซึ่งขาดการปรับปรุงเทคโนโลยีในด้านการผลิตที่เหมาะสม และยังขาดสุขลักษณะที่ดีสำหรับการผลิตอาหารให้มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคอีกทั้งยังขาดข้อมูลที่จำเป็นและยืนยันผลของการมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ดังนั้นทีมผู้วิจัยจึงดำเนินการพัฒนาปรับปรุง และเปลี่ยนแปลงกระบวนการผลิตเพื่อทำให้ผลิตภัณฑ์ให้ตรงต่อความต้องการของผู้บริโภค โดยอาศัยถึงความต้องการหรือความพึงพอใจของผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์ ผนวกกับการใช้แนวคิดปรัชญาเศรษฐกิจพอเพียง (Sufficient Economy) ทำการวิจัยและพัฒนาที่ตั้งอยู่บนพื้นฐานของความพอประมาณความมีเหตุผล และสร้างภูมิคุ้มกันที่ดีของชุมชน และสร้างแนวคิดการมีส่วนร่วมของประชาชน (People's Participation) เป็นเครื่องมือในการเข้ามามีบทบาทสำคัญในการการวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ของชุมชนตลอดจนถึงเป็นการสร้างมาตรฐานวิธีการปฏิบัติที่ดี (GMP) ให้เป็นสากลเพื่อประกันความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ให้แก่ผู้บริโภค

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1) เพื่อสนองโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมากจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.)
2) เพื่อพัฒนากระบวนการผลิตชาเมี่ยงและศึกษาคุณสมบัติการออกฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและสารชีวภาพของใบชาเมี่ยงและผลิตภัณฑ์เมี่ยง (ใบชาหมัก)
3) เพื่อยกระดับมาตรฐานการปฏิบัติที่ดีในสารผลิตอาหาร (Good manufacturing practice : GMP) สำหรับกลุ่มผู้ผลิตใบชาอบแห้งและเมี่ยง จังหวัดน่าน

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

แนวทางกระบวนการวิจัยและพัฒนาการผลิตชาใบเมี่ยงอย่างยั่งยืน ในงานวิจัยนี้แบ่งงานออกเป็น 2 ระยะ (ในสัญญาเดียวกัน)

ระยะที่ 1 ศึกษากระบวนการผลิตชาเมี่ยง (อบแห้ง) และการหมักเมี่ยงและทดสอบคุณสมบัติการออกฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและสารชีวภาพของชาเมี่ยง (อบแห้ง) และผลิตภัณฑ์ชาใบเมี่ยงหมัก ดังนี้

1.1) ศึกษาขั้นตอนกระบวนการผลิตชาใบเมี่ยง (อบแห้ง) และพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการผลิตชาใบเมี่ยง (เมี่ยงหมัก) เช่น น้ำที่ได้จากการหมักชาใบเมี่ยง โดยทำการตรวจสอบคุณสมบัติการออกฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและสารชีวภาพของชาใบเมี่ยงและผลิตภัณฑ์ ซึ่งได้แก่

วิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Benzie and Strain, 1996)
วิเคราะห์ฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน ตามวิธี DPPH-assay (Leong and Shui, 2000)
วิเคราะห์ฤทธิ์การต้านออกซิเจน ตามวิธี FRAP-assay (Ronald et al., 2005)
วิเคราะห์ฤทธิ์การต้านออกซิเจน ตามวิธี ABTS (Roberta et al., 1999)

1.2) ศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดใบชาอบแห้งและน้ำหมักจากเมี่ยง ต่อจุลินทรีย์ก่อโรคที่มีอาหารเป็นสื่อ

1.3) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางจุลชีววิทยา คุณภาพทางเคมี และกายภาพระหว่างการผลิตชาเมี่ยง และการหมักเมี่ยง

ระยะที่ 2 ดำเนินการยกระดับมาตรฐานการผลิตใบชาเมี่ยงในเขตพื้นที่จังหวัดน่าน ให้เข้าสู่มาตรฐานการผลิตการปฏิบัติที่ดีในการผลิตอาหาร (GMP) เป็นการสร้างเศรษฐกิจให้เกิดความยั่งยืน โดยสรุปแผนงานของโครงการ ดังแผนภาพต่อไปนี้

1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

กระแสการค้าโลกที่มีการแข่งขันในเรื่องคุณภาพมาตรฐานและความปลอดภัยของอาหารมาก ขึ้น เส้นทางและลำดับขั้นตอนของระบบคุณภาพอาหารที่ดีนั้นผู้ผลิตจะต้องมีโปรแกรมสุขลักษณะพื้นฐาน คือ หลักเกณฑ์และวิธีการที่ดีในการผลิตอาหาร หรือ Good Manufacturing Practice (GMP) รองรับ หลักเกณฑ์และวิธีการที่ดีในการผลิตอาหาร (GMP) คือ เกณฑ์หรือข้อกำหนดขั้นพื้นฐานที่จำเป็นในการผลิต และควบคุมเพื่อให้ผู้ผลิตปฏิบัติตามและทำให้สามารถผลิตอาหารได้อย่างปลอดภัย รวมการฝึกอบรม ระหว่างปฏิบัติงานโดยมีวิธีการสอนงานและการฝึกอบรมเพื่อสร้างจิตสำนึกและการสร้างความรู้ความเข้าใจ ตามระบบ GMP กับผู้ปฏิบัติงานและผู้ที่เกี่ยวข้อง ซึ่งเป็นแนวทางหนึ่งต่อการพัฒนาและยกระดับคุณภาพ ชาใบเมี่ยง (อบแห้ง) และผลิตภัณฑ์เมี่ยง (หมัก) ให้มีความยั่งยืนอย่างเป็นรูปธรรม อันเป็นการนำพืช อนุรักษ์ของไทยสู่การขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์สินค้าให้เป็นที่รู้จักอย่างแพร่หลายทั้งตลาดภายในและภายนอก ประเทศ

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) เพื่อสนองไว้ซึ่งโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมากจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.)
2) ได้ผลิตภัณฑ์ชาใบเมี่ยงที่มีคุณภาพและทราบฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันและต้านฤทธิ์จุลชีพของผลิตภัณฑ์
3) ทราบความหลากหลายของเชื้อ probiotic ระหว่างการหมักเมี่ยงที่มีผลต่อผู้บริโภค
4) สถานที่ผลิตชาใบเมี่ยงในเขตจังหวัดน่าน ได้ผ่านการรับรองตามมาตรฐานตามหลักหารปฏิบัติที่ดี (GMP)
5) เพื่อให้บริการสืบค้นข้อมูลสาสนเทศทางอินเตอร์เน็ตเกี่ยวกับการผลิตและประโยชน์ของชาใบเมี่ยงและผลิตภัณฑ์ชาใบเมี่ยง

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาสถานการณ์ในปัจจุบันของชาในประเทศไทย พบว่าสายพันธุ์ชาที่ปลูกแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ พันธุ์ชาอัสสัม (*Camellia sinensis* var. *assamica*) และพันธุ์ชาจีน (*Camellia sinensis* var. *sinensis*) กลุ่มพันธ์ชาอัสชัมบางครั้งเรียกว่า ชาพื้นเมือง ชาป่า หรือชาเมี่ยง เป็นชาที่มีใบขนาดใหญ่ เจริญได้ดีตามป่าที่มีร่มไม้กลุ่มพันธุ์ชาจีนที่มีใบขนาดเล็กกว่าชาอัสสัม พบได้หลายสายพันธุ์ ได้แก่ ชาพันธุ์อู่หลงเบอร์ 17 อู่หลงเบอร์ 12 ชิงชิงอู่หลง ถิกวนอิม และสี่ฤดูเป็นต้น ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกชาทั้งสิ้น 118,101 ไร่ คิดเป็นพื้นที่ปลูกชาอัสสัม 84.4% (98,544 ไร่) และชาจีน 16.6% (19,557 ไร่) ราคาขายใบชาสดและใบชาจีนสดเฉลี่ย 12 และ 50 บาทต่อกิโลกรัม ในปีพ.ศ. 2550 ประเทศไทยผลิตใบชาสดทั้งสิ้น 81,074 ตัน ซึ่งใบชาสด 77% นำมาผลิตเป็นชาแห้ง และ 23% นำไปผลิตเป็นเมี่ยง ในการผลิตชาแห้งใช้ชาอัสสัมคิดเป็น 96% ที่เหลือเป็นชาจีน ส่วนการผลิตเมี่ยงใช้เฉพาะชาอัสสัม (สายลม สัมพันธ์เวชโสภา และคณะ. 2550)

ชาเมี่ยง (*Camellia sinensis* var. *assamica*) แต่เดิมชาเป็นพืชท้องถิ่นของประเทศจีน ต่อมามีการแพร่ขยายมายังประเทศไทย ชาเมี่ยงเป็นผลิตภัณฑ์ท้องถิ่นทางภาคเหนือของประเทศไทยหลายจังหวัด อาทิ จังหวัดแม่ฮ่องสอน จังหวัดเชียงราย จังหวัดลำปาง จังหวัดแพร่ และจังหวัดเชียงใหม่ เป็นต้น ลักษณะทั่วไปเป็นใบเดี่ยว ปลายแหลม ใบมีความกว้าง เป็น 17-22 เซนติเมตร ขอบใบมีหยักเป็นฟันเลื่อยเด่นชัด ส่วนของก้านใบและด้านท้องใบมีขนปกคลุม แผ่นใบมีตั้งแต่สีเขียวอ่อนจนถึงสีเขียวเข้ม ชาเมี่ยงมีขั้นตอนโดยการนำใบชาสดมามัดเป็นกำ นึ่งแล้วหมักทิ้งไว้จนใบชาเปลี่ยนสภาพเป็นสีเหลือง ใบยุ่ย จึงนำมาบริโภค นิยมใช้เป็นของขบเคี้ยวหรืออมเป็นของว่างระหว่างการทางาน ยามว่างหลังอาหารหรือชงดื่มกับน้ำร้อน ช่วยผ่อนคลาย ความเหน็ดเหนื่อย ปัจจุบันมีอยู่หลายชนิด อาทิ เมี่ยงหวาน เมี่ยงเค็ม เมี่ยงหมี่ เมี่ยงขิง เมี่ยงใส่กระเทียมดอง ชาเมี่ยงเป็นแหล่งสำคัญของคาเทชิน (catechin) โดยมีปริมาณสูงถึง 30 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง อยู่ในกลุ่มฟีนอลซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชันที่มีคุณภาพสูง และยังพบ theaflavins, thearubigins ในชาเมี่ยง (สุรัติวดี ภาคอุทัย, 2551) เมี่ยง หรือชาบ้านห้วยน่านจัดอยู่กลุ่มพันธุ์ชาอัสสัม (*Camellia sinensis* var.*assamica*)สามารถเจริญเติบโตเร็ว ทนแล้ง ปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อมได้ดี พื้นที่ปลูกที่เหมาะสมตั้งแต่ 100 –1,000 เมตร ชาอัสสัมมีคาเฟอีนมากกว่าชาจีน ชาอัสสัม 1 กิโลกรัม มียอดชาสดประมาณ 700 ยอด ชาอัสสัม สามารถแบ่งออกเป็นพันธุ์ย่อยได้ 5 สายพันธุ์ คือ

1. พันธุ์อัสสัมใบจาง (Light leaved Assam Jat) ต้นมีขนาดเล็ก ยอดและใบมีสีเขียวอ่อน ลักษณะใบเป็นมันวาว ขอบใบหยักแบบฟันเลื่อย เป็นพันธุ์ที่อ่อนแอ ให้ผลผลิตต่ำและคุณภาพไม่ดี เมื่อนำมาทำชาจีนจะมีสีน้ำตาล

2. พันธุ์อัสสัมใบเข้ม (Dark leaved Assam Jat) ยอดและใบมีสีเขียวเข้ม ใบนุ่มเป็นมัน มีขนปกคลุม ขอบใบหยักแบบฟันเลื่อย เป็นพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงและมีคุณภาพดี เมื่อนำมาทำชาจีนจะมีสีดำ

3. พันธุ์มานิปุริ (Manipuri Jat) เป็นพันธุ์ที่แข็งแรง ให้ผลผลิตสูง ใบมีสีเขียวเข้มเป็นประกาย ขอบใบหยักแบบฟันเลื่อย ทนแล้งได้ดี

4. พันธุ์พม่า (Burma Jat) ใบมีสีเขียวเข้ม ใบแก่มีสีเขียวแกมน้ำเงิน ใบกว้าง แผ่นใบรูปไข่ ขอบใบหยักแบบฟันเลื่อย ทนต่อสภาพแวดล้อมได้ดีมาก

5. พันธุ์ลูไช (Lushai Jat) ขอบใบหยักลึก ปลายใบเห็นได้ชัด (ศูนย์ศึกษาและพัฒนาวนศาสตร์ชุมชนที่ 2 (เชียงราย). 2553)

การผลิตเมี่ยงได้ทำสืบทอดมาจากบรรพบุรุษ พื้นที่ปลูกชาอัสสัมสำหรับผลิตเมี่ยง 41,946 ไร่ โดยนำชาอัสสัม หรือชาเมี่ยง มานึ่ง มัดเป็นก้อน และหมักในถังหมัก ใบเมี่ยงสด 100 ตันจะผลิตเมี่ยงได้โดยเฉลี่ย 144 ตัน มีน้ำนึ่งและน้ำหมักซึ่งเป็นของเสียระหว่างการนึ่งและการหมักเกิดขึ้น 15 และ 20 ตัน ตามลำดับ ผลิตภัณฑ์เมี่ยงมีรสชาติฝาดถึงเปรี้ยว พบว่าการบริโภคเมี่ยงในเขตภาคเหนือของไทยจะนิยมบริโภคยามว่างขณะทำงานเพื่อความกระชุ่มกระชวย อาจมีการเติมเกลือ น้ำตาล ขิง แล้วแต่วัฒนธรรมการกินในแต่ละท้องถิ่น นอกจากนี้เมี่ยงยังใช้ในงานพิธีกรรม หรือบรวงสรวงต่างๆ ในท้องถิ่นภาคเหนือ การปลูกชาเพื่อผลิตชาแห้ง จะตัดแต่งกิ่ง 2 รูปแบบคือ ตัดแต่งกิ่งเล็ก และตัดแต่งกิ่งใหญ่ การตัดแต่งกิ่งเล็กจะทำทุกครั้ง หลังจากเก็บชา ส่วนการตัดแต่งกิ่งใหญ่ซึ่งจะทำการตัดแต่งปีละ 1 ครั้ง ในช่วงปลายปีของทุกปี มีปริมาณของเสียทั้งหมด 531,455 ตันต่อปี หรือเฉลี่ย 4.5 ตันต่อไร่ ของเสียประกอบด้วยใบอ่อน 4.9% ใบแก่ 24.1% กิ่ง ก้าน 67.2% และเมล็ด 3.8% ส่วนการปลูกชาเมี่ยงเพื่อผลิตเมี่ยงมีการตัดแต่งกิ่ง 1 ครั้งต่อปี ได้ ของเสีย 36,912 ตันต่อปี หรือเฉลี่ย 0.9 ตันต่อไร่ ของเสียประกอบด้วย ใบอ่อน 55% ใบแก่ 18% และเมล็ด 27% ซึ่งของเสียที่เกิดขึ้นทั้งหมด ผู้ปลูกชามักนำไปทำเป็นชาที่มีคุณภาพต่ำนำไปหมักเป็นปุ๋ยเพื่อบำรุงรักษาต้นชา

ชาสามารถจัดตามกระบวนการแปรรูปที่ต่างกันสามารถแบ่งได้ 3 ประเภทได้แก่

1) ชาที่ผ่านการหมักอย่างสมบูรณ์ (Fermented tea processing) เป็นชาที่นิยมดื่มกันทั่วโลก ได้แก่ ชาดาโดยเรียกตามลักษณะของใบชาแห้งที่ได้จะมีสีชาเข้ม-น้ำตาลเข้ม หรือชาแดง ซึ่งเรียกตามลักษณะของสีเมื่อสีของน้ำชาเป็นสีทองแดง หรือชาฝรั่งจะนิยมใช้ยอดชาพันธุ์อัสสัม เพราะชาอัสสัมจะมีสารโพลีฟีนอลสูง ซึ่งได้แก่ ชาคีมุนของจีน ชาของอินเดีย และชาของศรีลังกา การผลิตชามีกระบวนการแปรรูปโดยใบชาสดจะถูกผึ่งเพื่อลดความชื้น ตามด้วยนวดและ/หรือตีป่น จากนั้นเป็นกระบวนการหมักที่

ปล่อยให้เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันคาเทชินอย่างสมบูรณ์ คาเทชินจะเกิดออกซิเดชันและรวมตัวกันเป็นสารประกอบใหม่ที่มีสีเข้มขึ้นกว่าชาอู่หลง และชาเขียว จากนั้นอบแห้ง ตามด้วยการคัดเกรด และบรรจุ

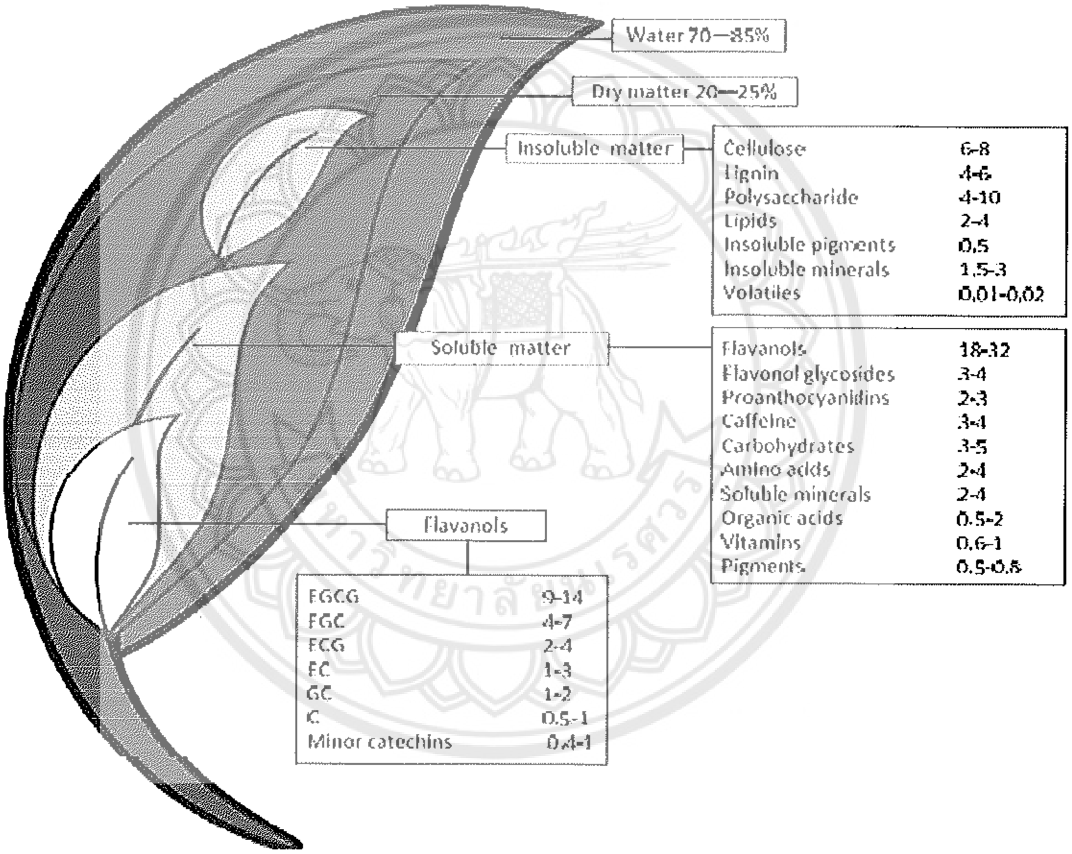
2) ชากึ่งหมัก (Semi-fermented tea processing)ได้แก่ ชาอูหลง (Oolong tea) เป็นชาหมักปานกลาง ค่อนข้างแก่ถึงหมักแก่ การหมักในระหว่างการผลิตบางส่วน หรือประมาณร้อยละ 10-80 วิธีการผลิตเริ่มจากตากชา (outdoor withering) ประมาณ 20-40 นาที ทำให้อุณหภูมิในยอดชาสูงขึ้น แล้วทำการนวดใบชา เพื่อให้ผิวนอกของใบช้ำ โดยจะกระตุ้นสารแทนนิน (tannin) ที่อยู่ภายใน ทำให้เกิดสีและรสฝาดขมในน้ำชาโดยการผึ่งแดด แล้วนำไปผึ่งในร่ม (indoor withering) พร้อมเขย่ากระตุ้นเพื่อให้ใบชาช้ำในบริเวณขอบใบ การผึ่งในร่มและเขย่ากระตุ้นยอดชาให้ตื่นตัว ทำให้เกิดการหมักเพียงบางส่วนที่ทำให้เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของคาเทชิน เกิดการรวมตัวกันของคาเทชินเป็นสารประกอบใหม่ทำให้สีน้ำชามีสีเข้มขึ้น สีเหลืองอมเขียว สีน้ำตาลอมเขียว ซึ่งความแก่-อ่อนของการหมักขึ้นกับระยะเวลาการผึ่งและเขย่ากระตุ้นให้เกิดการหมัก ส่งผลทำให้ชาอูหลงมีคุณภาพดี กลิ่นหอม รสชาติชุ่มคอ จากนั้นนาไปนวด (rolling) ขึ้นรูปให้เป็นเม็ด และนำไปอบแห้ง ตามด้วยการคัดเกรด และบรรจุ

3) ชาที่ไม่เกิดกระบวนการหมัก (Non-fermented tea processing) ได้แก่ ชาเขียว โดยนำยอดใบชาสดมาทำให้แห้ง ได้ใบชาที่มีความสดอุดมไปด้วยสารโพลีฟีนอล และยังมีสีเขียวจากคลอโรฟิลล์ที่ยังมีอยู่ สีน้ำชาเป็นสีเขียว หรือเหลืองอมเขียว กากชามีสีเขียวค่อนข้างสดชาเขียวรู้จักกันแพร่หลาย เช่น ชาหลงจิ่ง หวง ซันเหมา ชาญี่ปุ่น เป็นต้น โดยมีวิธีการผลิตเริ่มจากอบใบชาสดด้วยไอน้ำ (steaming) หรือคั่วบนกระทะร้อน (pan firing) เพื่อหยุดหรือยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidase, PPO) ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของคาเทชินจึงไม่เกิดการหมัก จากนั้นนาไปนวด (rolling) ให้เป็นเส้น แล้วนำไปอบแห้ง (drying) ตามด้วยการคัดเกรด (sorting) และบรรจุ (ธีรพงษ์ เทพกรณ์, 2545)

องค์ปะกอบทางเคมีในใบชาสด

ชาที่ผลิตทางการค้าส่วนใหญ่มาจาก 2 สายพันธุ์ คือ *Camellia sinensis* var. *sinensis* (ชาจีน, Chinese tea) และ *Camellia sinensis* var. *assamica* (ชาอัสสัม, Assam tea) การเก็บใบชาสดที่มีคุณภาพเพื่อนำมาเข้ากระบวนการผลิตจะใช้แรงงานคนในการเก็บ โดยเลือกเก็บเฉพาะยอดชาที่ตูมและใบที่ต่ำจากยอดตูมลงมา 2-3 ใบ (1 ยอด 2-3 ใบ) โดยทั่วไปยอดใบชาสดประกอบด้วยความชื้นประมาณ 75-80% โดยน้ำหนัก ส่วนที่เหลือ (20-25%) เป็นของแข็งทั้งหมด ของแข็งทั้งหมดประกอบด้วยส่วนที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble matter) และส่วนที่ละลายน้ำ (soluble matter) องค์ประกอบทางเคมีของส่วนที่ละลายน้ำและไม่ละลายน้ำ องค์ประกอบสำคัญในส่วนที่ละลายน้ำคือ โพลีฟีนอล (polyphenols) มีอยู่ประมาณ 10-25% โดยน้ำหนักแห้ง (Haslam, 2003) โพลีฟีนอลเป็นองค์ประกอบใน

ใบชาสดประกอบด้วยกลุ่มของสารประกอบ 6 กลุ่มคือ flavanols, hydroxy-4-flavonols, anthocyanins, flavones,flavonols และ phenolic acids โดยฟลาวานอล (flavanols) เป็นองค์ประกอบที่พบมากที่สุด (60-80% ของโพลีฟีนอล) คาเทชินที่พบมากในชา ได้แก่ (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), (-)-Epigallocatechin (EGC), (-)-Epicatechin-3-gallate (ECG) และ (-)-Epicatechin(EC) คาเทชินเหล่านี้มีอยู่ประมาณ 90% ของคาเทชินทั้งหมด) กลุ่มของคาเทชินที่พบในปริมาณน้อยได้แก่ (+)Gallocatechin (GC), (+)-Catechin (C) และคาเทชินอื่นๆ เช่น (-)-Gallocatechin gallate (GCG) และ (-)-Catechin gallate (CG) (Zhen *et al*., 2002)



ภาพ 1 องค์ประกอบทางเคมีของใบชาสด (ปรับปรุงจาก Zhen et.al., 2002)
องค์ประกอบทางเคมีในส่วนของ insoluble matter, soluble matter
และ flavonols มีหน่วยเป็นร้อยละโดยน้ำหนักแห้ง
(ที่มา : ธีรพงษ์ เทพกรณ์. 2555)

การพัฒนากระบวนการผลิตชาใบเมี่ยง (อบแห้ง)

การผลิตชาให้มีคุณภาพมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายประการ ได้แก่ การจัดทำระบบการซื้อขายใบชาสด และชาแห้ง การศึกษาเทคโนโลยีภายหลังการเก็บเกี่ยว ระบบการขนส่งเพื่อรักษาคุณภาพของใบชาสด ก่อนเข้าสู่โรงงานการผลิต ในส่วนของการแปรรูปเพื่อรักษาคุณภาพของผลิตภัณฑ์ให้มีสี กลิ่นรสชาติที่ดี ศึกษากระบวนการหมัก ศึกษาสภาวะการแปรรูปเพื่อรักษาคุณภาพของชาผง เช่น การอบแห้ง การบด เป็นต้น ควรคำนึงถึงความสำคัญต่อการควบคุมคุณภาพและการจัดการด้านความปลอดภัย (food safety) โดยจัดตั้งระบบ GMP สำหรับการผลิตชา จัดทำระบบการควบคุมคุณภาพการแปรรูปชา การคัดเกรดใบชา การออกแบบระบบการผลิตที่ถูกสุขลักษณะและการเพิ่มสมรรถนะของการทำงานของเครื่องมือที่ใช้ในกระบวนการผลิตให้มีประสิทธิภาพ (สายลม สัมพันธ์เวชโสภา และคณะ. 2551)

การพัฒนาเมี่ยง (เมี่ยงหมัก)

การผลิตเมี่ยงจะมีน้ำนึ่งเมี่ยงทิ้งทุกวันหรือสัปดาห์ ในแต่ละปีมีน้ำนึ่งเมี่ยงทิ้งปีละ 8,1881 ล้านลิตร โดยจะมีสารประกอบที่ได้จากน้ำเมี่ยงผสมอยู่ เช่น แทนนิน (tannin) โพลีฟีนอล (polyphenol) และคาเฟอีน (caffeine) สารประกอบต่างๆ เหล่านี้จะส่งผลต่อสิ่งแวดล้อม ในการแปรรูปน้ำเมี่ยงให้มีคุณภาพควรศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางด้านชีวเคมีและจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในระหว่างการผลิต ความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์โดยยึดหลักการ GMP ในการผลิตอาหาร รวมถึงการนำเทคโนโลยีการบรรจุมาพัฒนาเพื่อสร้างความปลอดภัยและสะดวกต่อการนำไปใช้ ตลอดจนถึงการนำของเสียจากกระบวนการผลิตเมี่ยงหมักมาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุดอันเป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับเมี่ยง (สายลม สัมพันธ์เวชโสภา และคณะ. 2551)

อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ คือ อะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนที่ไม่มีคู่ อยู่วงนอกสุดของออร์บิทัลอะตอม หรือโมเลกุลเหล่านี้ไม่เสถียร คือมีอายุสั้นมากประมาณ 1 หรือ 10^{-3} - 10^{-10} วินาที และไวต่อการทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลในร่างกาย อนุมูลอิสระสามารถทำลายเซลล์หรือเนื้อเยื่อ ส่งผลให้เกิดอาการผิดปกติหรือก่อโรคในคน การเกิดอนุมูลอิสระมีสาเหตุมาจากภายนอกและภายในร่างกาย สาเหตุภายนอก ได้แก่ มลพิษในอากาศ ควันบุหรี่ แสงแดด รังสีแกรมมา คลื่นความร้อน สำหรับแหล่งที่มาของสารอนุมูลอิสระภายในร่างกายคือ การเกิดเมตาบอลิซึมของออกซิเจนภายในเซลล์ หรือการย่อยทำลายแบคทีเรียในเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ reactive oxygen species (ROS) เช่น superoxide (O_2^-), hydroxyl free radical (HO^-), oxide ของไนโตรเจน (NO, NO_2^-) และ lipid radical (RO^-, ROO^-, R^-) อนุมูลอิสระ

เหล่านี้ส่วนใหญ่อาจเกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมปกติของร่างกาย ซึ่งร่างกายมีกลไกป้องกันการทำลายเซลล์ และซ่อมแซมส่วนที่ถูกทำลายจากอนุมูลอิสระ (Simic and Taylor, 1988) กลไกต่างๆ เหล่านี้ประกอบด้วยเอนไซม์ต่างๆ เช่น catalase, peroxidase, superoxidase dismutase และ cytochrome oxidase นอกจากนี้ยังมีสารที่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระในธรรมชาติ เช่น สารในกลุ่มของเบต้าแคโรทีน วิตามินอี วิตามินซี และสารประกอบหลักในพืชที่มีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ คือ สารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ กรดฟีนอลิก และแอนโธไซยานิน ซึ่งพบทั่วไปในใบ ลำต้น และเปลือกของพืช มีความสามารถในการทำลายฤทธิ์ของอนุมูลอิสระ จึงเรียกว่า สารต้านอนุมูลอิสระ หรือ antioxidant กลไกการต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิกจะอยู่ในรูปของการกำจัดอนุมูลอิสระการให้ไฮโดรเจนอะตอม และการกำจัดออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน รวมทั้งการรวมตัวกับโลหะ (Ajila et.al.,2010)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Huang *et al.* (2005) ศึกษาผลของ Se ต่อการรักษาคุณภาพของชาพันธุ์ชาจีน ระหว่างกระบวนการผลิตชาในฤดูใบไม้ร่วง พบว่า การเพิ่มสาร Se จะช่วยรักษาคุณภาพของชาในการเก็บรักษานาน 4 เดือน และการใช้ Se ปริมาณ 150 kg ha^{-1} ก่อนระยะเก็บเกี่ยว ทำให้ปริมาณวิตามินซีในใบชาเขียวเพิ่มอย่างมีนัยสำคัญ โดยปริมาณวิตามินซีจะลดลงอย่างช้าๆ ระหว่างการเก็บรักษา นอกจากนี้ในระหว่างการเก็บรักษาในฤดูใบไม้ร่วง จะมีปริมาณวิตามินซีในใบชาสูงกว่าการเก็บรักษาในฤดูร้อน และฤดูใบไม้ผลิ สำหรับปริมาณ โพลีฟีนอล (polyphenol) และ คลอโรฟิลล์ (chlorophyll) ในระยะ 60 วันแรกของการใส่ปุ๋ย Se ไม่พบความแตกต่างระหว่างชาที่ใส่ปุ๋ย Se กับชุดควบคุม (control) นอกจากนี้พบว่า Se สามารถลดความผันแปรของปริมาณ polyphenol ระหว่างฤดูกาลได้ สำหรับการทดสอบทางประสาทสัมผัสและการเปลี่ยนแปลงของ polyphenol ของใบชาในระหว่างการเก็บรักษานาน 4 เดือน พบว่า ปริมาณโพลีฟีนอล (polyphenol) สูงกว่าใบชาที่ไม่ได้รับ Se หลังจากเก็บรักษาไว้นาน 60 วัน ส่วนคุณภาพทางประสาทสัมผัส พบว่าคุณภาพของกลิ่นและความหวานของชาที่ได้รับ Se มีคุณภาพดีกว่าชาที่ไม่ได้รับ Se รวมทั้งมีรสขมน้อยกว่า Perva – Uzunalic *et al.* (2006) ได้ศึกษาประสิทธิภาพการสกัดสารสำคัญจากชาเขียว (*Camellia sinensis*) สายพันธุ์ Fanning Belas (ประเทศจีน) โดยใช้ตัวทำละลายบริสุทธิ์ชนิดแตกต่างกัน (แอซีโทน เอทานอล เมทานอล แอซิโทไนไทรล์ และน้ำ) และอุณหภูมิที่แตกต่างกัน (60 80 95 และ 100 องศาเซลเซียส) และเวลาต่างกัน (5-240 นาที) สารสกัดจากชาถูกนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของคาเทชินชนิดหลัก EC, EGC, ECG, EGCG และคาเฟอีน พบว่าวัตถุดิบเริ่มต้นมีปริมาณคาเทชินชนิดหลัก 191 กรัมต่อกิโลกรัม คาเฟอีน 36 กรัมต่อกิโลกรัม และพบว่ากระบวนสกัดชาเขียวมีปริมาณของคาเทชินชนิดหลักมีค่าอยู่ช่วง 280-580 กรัมต่อกิโลกรัมสารสกัดแห้ง ปริมาณคาเฟอีนในชาเขียวสกัดมีค่าอยู่ในช่วง 75 กรัมต่อ

กิโลกรัม ซึ่งกระบวนการสกัดที่สามารถสกัดคาเทชินให้มีประสิทธิภาพสูงสุดคือการสกัดด้วยน้ำ ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที (ร้อยละ 97) และอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (ร้อยละ 90) โดยได้พบการสูญเสียคาเทชิน เมื่อใช้อุณหภูมิสูงและเวลานานเกินไปในการสกัด

Perva – Uzunalic et al. (2006) ได้ศึกษาประสิทธิภาพการสกัดสารสำคัญจากชาเขียว (*Camellia sinensis*) สายพันธุ์ Fanning Belas (ประเทศจีน) โดยใช้ตัวทำละลายบริสุทธิ์ชนิดแตกต่างกัน (แอซีโทน เอทานอล เมทานอล แอซิโทไนไทรล์ และน้ำ) และอุณหภูมิที่แตกต่างกัน (60 80 95 และ 100 องศาเซลเซียส) และเวลาต่างกัน (5-240 นาที) สารสกัดจากชาถูกนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของคาเทชินชนิดหลัก EC, EGC, ECG, EGCG และคาเฟอีน พบว่าวัตถุดิบเริ่มต้นมีปริมาณคาเทชินชนิดหลัก 191 กรัมต่อกิโลกรัม คาเฟอีน 36 กรัมต่อกิโลกรัม และพบว่ากระบวนสกัดชาเขียวมีปริมาณของคาเทชินชนิดหลักมีค่าอยู่ช่วง 280-580 กรัมต่อกิโลกรัมสารสกัดแห้ง ปริมาณคาเฟอีนในชาเขียวสกัดมีค่าอยู่ในช่วง 75 กรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งกระบวนการสกัดที่สามารถสกัดคาเทชินให้มีประสิทธิภาพสูงสุดคือการสกัดด้วยน้ำ ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที (ร้อยละ 97) และอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (ร้อยละ 90) โดยได้พบการสูญเสียคาเทชิน เมื่อใช้อุณหภูมิสูงและเวลานานเกินไปในการสกัด

Komes *et al.* (2010) ได้ศึกษาอิทธิพลร่วมของสภาวะและระยะเวลาการเตรียมชาเขียวต่อปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณของสารฟีนอลทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และสารที่ไม่ใช่ฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในชาเขียวชนิดต่างๆ โดยวิธีวัดปริมาณแสง (Spectrophotometric) ขณะที่ 7 flavan-3-ols กรดฟีนอลิก (Phenolic acid) 6 ชนิด และเมธิลแซนทีน (Methylxanthines) 3 ชนิด จะถูกจำแนกและหาปริมาณด้วย HPLC-PDA ในกลุ่มชาเขียวที่ถูกทดสอบ ชาเขียวบรรจุถุงยี่ห้อ Twining's of London ได้รับการรับรองว่ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคสูงที่สุด (3585 มิลลิกรัมของกรดแกลิกต่อลิตร) สารจำพวกฟีนอลิคที่พบมากที่สุดในชาเขียวคือ 7 flavan-3-ols ขณะที่ EGCG เป็นสารที่พบมากในชาทุกชนิด (94.54-357.07 มิลลิกรัมต่อลิตร) ปริมาณสูงสุดของคาเฟอีน ซึ่งส่วนใหญ่แล้วเป็นเมธิลแซนทีน ผลการทดลองพบว่าประสิทธิภาพในการสกัดสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่นำมาศึกษาจากชาเขียวนั้นขึ้นอยู่กับสภาวะในการสกัด และประสิทธิภาพการสกัดสูงสุดคือการสกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที (ชนิดผง) 15 นาที (ชนิดถุง) และ 30 นาที (ชนิดใบ) ชาเขียวทุกชนิดแสดงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในร่างกายสิ่งมีชีวิตอย่างมีนัยสำคัญ เป็นการยืนยันผลว่าชาเขียวเป็นแหล่งที่ดีที่สุดของสารต้านอนุมูลอิสระ Ananingsih *et al.* (2011) ศึกษาความคงตัวและการตรวจวัดคาเทชินชนิดต่างๆ ในชาเขียวระหว่างกระบวนการแปรรูปอาหารและการเก็บรักษา พบว่าการเปลี่ยนแปลงไอโซเมอร์และการเสียสภาพเป็นสาเหตุหลักของการเปลี่ยนแปลงคาเทชินในชาระหว่างการแปรรูปและการเก็บรักษา และยังมีปัจจัยหลายๆ อย่างเกี่ยวข้อง เช่น ระหว่างการแปรรูป

และการเก็บรักษาที่ pH และอุณหภูมิต่ำจะทำให้คาเทชินในชามีความคงตัวมากขึ้นเนื่องจากสามารถคงตัวได้ในสภาวะที่เป็นกรด (pH $<$ 4) อย่างไรก็ตามพบว่าคาเทชินจะเสียสภาพอย่างรวดเร็วในสภาวะเป็นด่าง การให้ความร้อนทำให้คาเทชินในชาลดลงเนื่องจากเกิดการเสียสภาพ การเกิดออกซิเดชัน การเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง และการรวมตัวเป็นสารโมเลกุลใหญ่หรือพอลิเมอร์ นอกจากนี้ที่ระดับออกซิเจนสูงและความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระต่ำ ทำให้การเกิดออกซิเดชันของคาเทชินเพิ่มขึ้น และยังพบว่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของคาเทชินยังสามารถเพิ่มขึ้นได้เมื่อมีไอออนโลหะอยู่ด้วย การเติมซูโครส กรดแอสคอร์บิก และกรดซิตริกลงไปในเครื่องดื่มชาอาจจะทั้งชะลอและเร่งการเสียสภาพของคาเทชิน ในเครื่องดื่มชา ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาวะอื่นๆ ด้วย การตรวจวัดหลายๆ วิธีได้ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อวิเคราะห์ คาเทชินในชา ส่วนใหญ่จะใช้ LC และ CE เพื่อให้การแยกจำแนก และการหาปริมาณคาเทชินที่เกิดขึ้นได้ดี

มีรายงานการตรวจพบ Lactic acid bacteria หลายชนิดในเมี่ยงและอาหารหมักพื้นบ้านของไทย เช่น เชื้อ *Pediococcus pentosaceus, Pediococcus acidilactici, Lactobacillus, pentosus Lactobacillus plantarum, Lactobacillus* sp. (Tanasupawat S. and Daengsubha W., 1983 ; Tanasupawat S. at al,1992) เชื้อ Lactic acid bacteria หลายชนิดมีคุณสมบัติเป็น probiotic ที่ส่งผลดีต่อสุขภาพของผู้บริโภค (Jay, Loesser and Golden, 2005) เชื้อบางชนิด เช่น *Pediococcus pentosaceus* สร้างสารเมือกเหนียวที่มีประโยชน์ทางอุตสาหกรรม (Smitinont et al.,1999) เชื้อ probiotic มีคุณสมบัติในการยับยั้ง และทำลายจุลินทรีย์ก่อโรคได้หลายชนิด นอกจากนี้ยังพบว่า มีสารกลุ่ม prebiotics ที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของ probiotic ในลำไส้มนุษย์ ซึ่งส่วนมากแล้วเป็นสารกลุ่ม oligosaccharides ช่วยทำให้ probiotic มีชีวิตรอดได้ดีในระบบทางเดินอาหาร ประโยชน์ของ probiotic bacteria คือช่วยแก้ปัญหา lactose intolerance ช่วยป้องกันการอักเสบของกระเพาะอาหารและลำไส้ ลด cholesterol ลดขนาดและการเจริญของเนื้องอก ยับยั้งเชื้อ candida ในช่องคลอด ป้องกันมะเร็งลำไส้ ยับยั้งการติดเชื้อ Helicobacter pylori ต้านทานเชื้อโรคในลำไส้ ป้องกันโรคอุจจาระร่วง เป็นต้น (Jay, Loesser and Golden, 2005)

บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
2. เครื่องระเหยภายใต้สุญญากาศ (rotary evaporator)
3. เครื่องวัดความแน่นเนื้อ (fruit texture analyzer)
4. เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (digital refractometor)
5. เครื่องวัดสี (Minolta รุ่น DP-1000)
6. เครื่องผสมสาร (Vortex mixer)
7. เครื่องชั่งไฟฟ้า
8. ตะเกียงแอลกอฮอล์
9. ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 32.5 ± 5 องศาเซลเซียส
10. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow hood with heap filter or Biosefty cabinet)
11. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
12. ตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส
13. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส
14. หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)
15. อ่างน้ำร้อน (Water bath)
16. 96 microwell plate

วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. ห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop)
2. เข็มเขี่ยเชื้อ (Needle)
3. กรวยกรองสำลี
4. จานเพาะเชื้อ (Glass Petri dishes 15x100 mm)
5. ทิป (Tip) ขนาด 100 µl และ 1,000 µl
6. ไมโครปิเปตต์ (Micropipette)
7. บีกเกอร์ (Beaker)

8. บีกเกอร์สแตนเลส
9. ไม้พายสแตนเลส
10. ไม้พันสำลี
11. หลอดทดลอง (test tube)
12. อลูมิเนียมฟลอยด์ (Aluminium foil)
13. ผ้าขาวบาง

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. Tryptone soy agar (TSA)
2. Tryptone soy broth (TSB)
3. Potato dextose agar (PDA)
4. Peptone water
5. De Man Rogosa and Sharpe agar (MRS agar)
6. น้ำ
7. เอทานอล (Ethanol)
8. เมทานอล (Methanol)
9. Folin phenol reagent
10. โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)
11. โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต (sodiumhydrogencarbonate)
12. Gallic acid
13. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
14. ฟีนอฟทาลีน (phenolphthalein)
15. สารละลาย metaphosphoric acetic acid
16. สารละลาย Indophenol
17. สารละลายมาตรฐาน ascorbic acid
18. 7mM ABTS
19. Potassium persulfate (K_2SO_5)
20. ฟลูออเรสซีน (Fluorescene sodium salt)
21. 2',2' – Azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride (AAPH)
22. Phosphat buffer pH7.0

23. Dimethyl sulfoxide (DMSO)
24. 2,3,5 - triphenyltetrazolium chloride (TTC)

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ

1. *Aspergillus niger* TISTR 3012
2. *Bacillus cereus* TISTR 687
3. *Candida albicans* TISTR 5779
4. *Escherichia coli* TISTR 780
5. *Lactobacillus plantarum* TISTR 879
6. *Proteus mirabilis* TISTR 100
7. *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 781
8. *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5049
9. *Salmonella typhimurium* TISTR 1469
10. *Staphylococcus aureus* TISTR 517
11. *Streptococcus faecalis* TISTR 459

วิธีการดำเนินงานวิจัย

การดำเนินงานแบ่ง 2 ระยะคือ

<u>ระยะที่ 1</u>

<u>ตอนที่ 1 การสำรวจและเก็บตัวอย่าง</u>

ทำการสำรวจกระบวนการผลิตของใบชาเมี่ยงอบแห้งและการหมักเมี่ยงในเขตจังหวัดน่าน วิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ เคมี และจุลชีววิทยา (ตามวิธีการในตอนที่ 2 และ 3)

<u>ทางกายภาพ</u>

- วิเคราะห์สี L a* b* Chroma และ Hue angle ด้วย Hunter lab colorimeter
- ความชื้น (AOAC, 2000)
- ความแน่นเนื้อด้วย texture analyzer

ทางเคมี

- ค่าความเป็นกรด-ด่าง (AOAC, 2000)
- การหาปริมาณร้อยละของกรดแลคติก
- การหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP (Benzie and Strain, 1996)
- การหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH (Leong and Shui, 2000)
- การหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS (Roberta et al., 1999)
- การปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic compound) โดยวิธี Folin-Ciocalteu reagent (Benzie and Strain, 1996.)

ทางจุลชีววิทยา

- วิเคราะห์ปริมาณ lactic acid bacteria ในใบเมี่ยง (หมัก) ด้วยเทคนิค pour plate ในอาหาร MRS agar ตามวิธีของ ISO 7218:2007

ตอนที่ 2 ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิและเวลาต่อคุณภาพของใบชาอบแห้ง และคุณภาพน้ำชา

2.1 อิทธิพลของอุณหภูมิและเวลาต่อคุณภาพใบชาอบแห้งโดยทำการเปรียบเทียบกับวิธีการผลิตแบบดั้งเดิม จากนั้นวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านจุลชีพ ลักษณะทางกายภาพ เช่น สี กลิ่น รส การวิเคราะห์ด้านอนุมูลอิสระจากใบชา การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดำเนินการดังนี้

สกัดสารออกฤทธิ์จากพืชตัวอย่าง

การสกัดสารออกฤทธิ์จากชาใบเมี่ยง (ดัดแปลงจาก Yamazaki et.al., 2007)

1. บดตัวอย่างให้ละเอียดด้วยเครื่องบดหยาบ (blender) แล้วใส่ในขวดขนาด 2 ลิตร
2. เติมเมทานอลปริมาตร 2 ลิตร ลงในขวดแก้ว ปิดฝา ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 75 ชั่วโมง
3. กรองสารด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 42 แล้วนำไปประเหยให้แห้งด้วย evaporation เพื่อให้ได้สารสกัดหยาบ (crude extract)
4. กากของใบชาที่ได้จากการสกัดด้วยเมทานอล จะนำมาสกัดอีกครั้งด้วยเฮกเซน ปริมาตร 2 ลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 72 ชั่วโมง กรอง และระเหยให้แห้งเช่นเดียวกับการสกัดจากเมทานอล

การหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Total polyphenol content)

การหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดโดยวิธี Folin-Ciocalteu reagent (Benzie and Strain, 1996.) เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent (1:10) ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง เติมสารสกัดตัวอย่าง 1.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที เติมสารละลาย Na_2CO_3 (7.5%) ปริมาตร 4.0 มิลลิลิตร ปิดจุก ผสมให้เข้ากันและเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก (Gallic acid) ความเข้มข้นระหว่าง 0.2 – 3.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงผลลัพธ์เป็นมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อ 100 กรัมตัวอย่าง (mgGAE/100g)

การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

1. การวิเคราะห์โดยวิธี Ferric Reducing Antioxidant Power; FRAP (Benzie and Strain, 1996)

เติมน้ำกลั่น 8.60 มิลลิลิตร ในหลอดทอลอง เติมสารสกัดตัวอย่าง 1.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 นาที เติมสารละลาย FRAP reagent 0.4 มิลลิลิตร แล้ววัดการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 596 นาโนเมตร แสดงผลลัพธ์เป็นมิลลิกรัมเฟอริกต่อ 100 กรัมตัวอย่าง ($mgFe^{2+}$/100g)

2. การวิเคราะห์โดยวิธี DPPH assay ตามวิธีของ Leong and Shui, 2000

ชั่ง 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ปริมาณ 3.5 มิลลิกรัม ในเมทานอล 100 มิลลิลิตร เติมสารละลาย DPPH ที่ผ่านการเจือจางแล้วลงในหลอดทดลองหลอดละ 5 มิลลิลิตร ปิเปตตัวอย่างมา 5 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร จากนั้นเติมตัวอย่างที่ผ่านการเจือจางแล้วที่ความเข้มข้นต่างๆ ทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นเติมเมทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อปรับปริมาตรให้ครบหลอดละ 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ครั้ง ตั้งไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร เพื่อหา % DPPH Inhibition แล้วสร้างกราฟ % Inhibition

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

$A_{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างเปล่า (DPPH อย่างเดียว)

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายของสารสกัดตัวอย่าง

3. การวิเคราะห์โดยวิธี ABTS assay ตามวิธีของ Roberta et al., 1999

เตรียมสารละลาย ABTS (2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) โดยผสม 7 mM ABTS กับ 2.45 mM $K_2S_2O_8$ (Dipotassium peroxodisulphate) ให้เข้ากันแล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน ABTS : น้ำเท่ากับ 1:4.2 วัดค่าการดูดกลืนแสงให้อยู่ในช่วง 0.7-0.9 ที่ความยาวคลื่น 734 nm และเตรียมสารสกัดตัวอย่างให้ได้ ความเข้มข้น 1 mg/ml ด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิด (ใช้ 20% DMSO ช่วยในการละลาย) ผสมสารละลาย ABTS ที่เจือจางแล้วกับสารสกัดตัวอย่างและตัวทำละลายแต่ละชนิดผสมให้เข้ากัน โดยให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 2,120 µl วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยใช้ Vitamin C และTrolox เป็นสารมาตรฐานในการเปรียบเทียบ คำนวณหาปริมาณ Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) และค่า Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VEAC) จากกราฟมาตรฐานที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดกับค่าabsorbance ของ Vitamin C และ Trolox

<u>ตอนที่ 3 ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิและระยะเวลาการนึ่งใบชาเมี่ยงต่อการหมักและคุณภาพของเมี่ยงทางกายภาพ เคมี และจุลชีววิทยา</u>

ศึกษาผลของปัจจัยทางด้านอุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้ในการนึ่งใบชาเมี่ยงที่มีผลต่อคุณภาพของเมี่ยง (เมี่ยงหมัก) โดยดำเนินการดังนี้

นึ่งใบชานาน 30 นาที 45 นาที และ 60 นาที ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จากนั้นรอให้เย็น บรรจุใส่ถังหมัก เติมเกลือ แล้วอัดให้แน่น ปิดฝา หมักที่อุณหภูมิห้อง ทำการเก็บตัวอย่างตรวจวิเคราะห์เป็นเวลา 0 7 14 21 28 56 และ 68 วัน ตามลำดับ จากนั้นวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ เคมี และจุลชีววิทยา ดังนี้

<u>คุณภาพทางกายภาพ</u>

- วิเคราะห์ค่าสีด้วยเครื่องวัดสี Hunter lab
- ความชื้น (AOAC, 2000)
- ความแน่นเนื้อด้วย texture analyzer

<u>วิเคราะห์คุณภาพทางเคมี</u> ดังนี้

- ค่าความเป็นกรด-ด่าง
- เปอร์เซ็นต์กรดแลคติก
- ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP, DPPH ABTS และ Total phenolic compound เช่นเดียวกับตอนที่ 2

<u>การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางจุลชีววิทยา</u> ดำเนินการดังนี้

1) วิเคราะห์ total viable plate count ด้วยเทคนิค pour plate ในอาหาร plate count agar

2) วิเคราะห์ total lactic acid bacteria ด้วยเทคนิค pour plate ในอาหาร MRS agar

3) วิเคราะห์ lactic acid bacteria สายพันธุ์ต้านเกลือน้ำดีในอาหาร MRS agar ที่เติม bile salt ด้วยเทคนิค pour plate

4) วิเคราะห์รา และยีสต์ ด้วยเทคนิค spread plate บนอาหาร martin's medium agar

5) แยกเชื้อ Lactic acid สายพันธุ์ที่ทนเกลือน้ำดีเพื่อ Identity ชนิดของเชื้อตามแนวทางของ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1994) และเอกสารที่เกี่ยวข้อง และศึกษาคุณสมบัติการทน pH และการทนเกลือ ทดสอบ morphological characteristics, cultural characteristics physiological and biochemical characteristics เช่นปฏิกิริยา hydrolysis : ของ gelatin, aesculin, hippurate และ arginine, sugar fermentation, nitrate reduction, IMViC test, slime production เป็นต้น

6) การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดจากน้ำใบเมี่ยงหมัก ดำเนินการดังนี้

การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดจากน้ำใบเมี่ยง (หมัก) โดยใช้วิธี Disc diffusion method และ Microdilution method เพื่อหาค่า MIC (Minimum Inhibitory Concentration)

นำน้ำหมักจากใบเมี่ยงกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เพื่อนำไปใช้ทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบ ใช้เทคนิค Disc diffusion วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของ Clear zone (inhibition zone) และหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อ หรือค่า MIC (Minimum Inhibitory Concentration)

- เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella typhimurium, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Streptococcus faecalis*
- เชื้อยีสต์ที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ *Candida albicans*
- อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ TSA (Tryptone soy Agar) สำหรับแบคทีเรีย ส่วนเชื้อยีสต์และราใช้อาหาร PDA
- ใช้ยาปฏิชีวนะ Bacitracine และ gentamicin disc เป็น Positive Control

<u>ระยะที่ 2</u>

การดำเนินการยกระดับมาตรฐานการผลิตใบชาเมี่ยงในพื้นที่ จังหวัดน่าน ให้เข้าสู่มาตรฐานการผลิตการปฏิบัติที่ดีในการผลิตอาหาร (GMP)

1. สำรวจและวิเคราะห์กระบวนการผลิตชาใบเมี่ยงและผลิตภัณฑ์ชาใบเมี่ยง
2. จัดทำระบบการผลิตตามหลักปฏิบัติการผลิตที่ดีในการผลิตอาหาร (GMP) ให้แก่ผู้ผลิต
3. จัดอบรมให้ความรู้ก่อนการจัดทำระบบ GMP และภายหลังการจัดทำระบบ GMP
4. ดำเนินการติดตามผลการจัดทำระบบ GMP กับกลุ่มผู้ผลิตที่เข้าร่วมจัดทำระบบโดยความสมัครใจ
5. ติดต่อประสานงานหน่วยงานที่ให้การรับรองมาตรฐาน GMP เพื่อขอการรับรองระบบมาตรฐานการการผลิต

มหาวิทยาลัยนเรศวร

บทที่ 4
ผลการทดลอง

การดำเนินงานแบ่ง 2 ระยะ

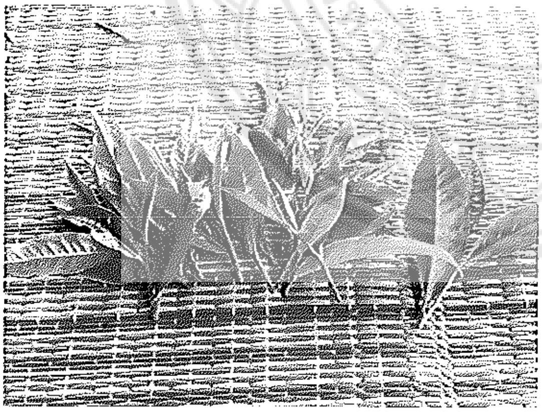
<u>ระยะที่ 1</u>

4.1 การสำรวจและเก็บตัวอย่าง

- **ภาพการสำรวจและเก็บตัวอย่างชาเมี่ยง**

ภาพ 2 ลักษณะต้นของชาเมี่ยง

ภาพ 3 ลักษณะใบของชาเมี่ยง



ภาพ 4 ลักษณะยอดชาเมี่ยง

ภาพ 5 ลักษณะใบชาหมัก

ทำการสำรวจกระบวนการผลิตของใบชาเมี่ยงอบแห้งและการหมักเมี่ยงในเขตจังหวัดน่านและพื้นที่ใกล้เคียง จากนั้นวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ เคมี และจุลชีววิทยา ผลการสำรวจกระบวนการผลิตเมี่ยงชาหมักในจังหวัดน่าน สรุปขั้นตอนได้ดังภาพ 6 และ ภาพ 7

ขั้นตอนการหมักเมี่ยง (ชาหมัก) พื้นบ้านของเกษตรกร บ้านศรีนาป่าน ตำบลเรือง อำเภอเมือง จังหวัดน่าน

รับใบชาสด

↓

มัดใบชาเป็นกำด้วยตอก

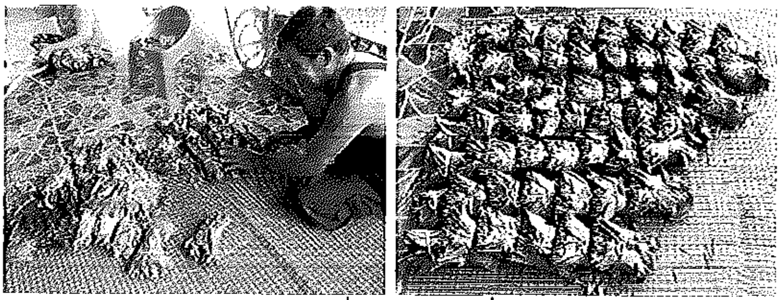
↓

เรียงใส่ถังไม้ ปิดด้วยผ้า

↓

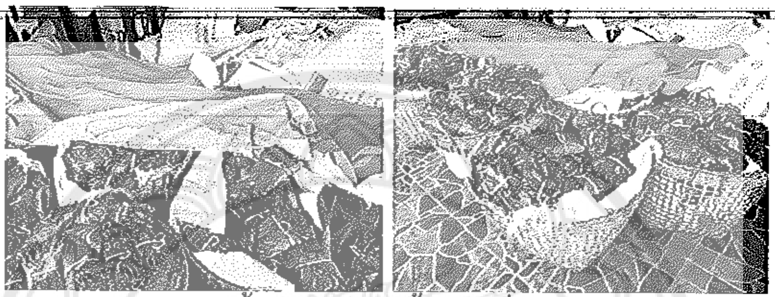
นึ่ง 40 – 50 นาที

↓



เทออกผึ่งให้เย็นบนเสื่อ

↓



เก็บใส่ตะกร้า คลุมด้วยผ้าทิ้งไว้ 2 วัน (รับซื้อใบชานึ่งแล้วจากเกษตรกรรายย่อย)

↓

เรียงเป็นชั้นใส่โอ่งที่รองด้วยแผ่นพลาสติก

แต่ละชั้นฉีดด้วยน้ำให้ชื้น

แต่ละชั้นโรยเกลือเม็ด 150 กรัมต่อชั้น (ชั้นละ 40 – 60 กำ)

↓

บรรจุใบชาให้เต็ม

↓

ปิดทับด้วยใบเหมียด

↓

ปิดให้แน่นด้วยพลาสติก

หมักที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 3 เดือน

ได้เมี่ยงเก็บไว้ได้นาน 1 -2 ปี

↓

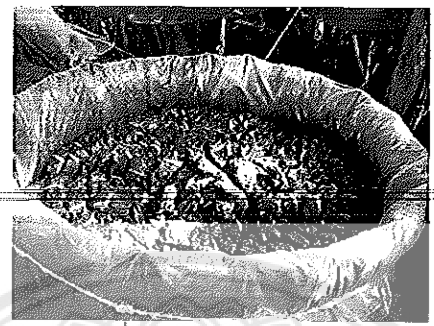
รอจำหน่าย

ภาพ 6 ขั้นตอนการผลิตชาเมี่ยงของเกษตรกร บ้านศรีนาป่าน ตำบลเรือง อำเภอเมือง จังหวัดน่าน

ขั้นตอนการหมักเมี่ยง (ชาหมัก) พื้นบ้านของเกษตรกร บ้านป่าแดด ตำบลช่อแฮ อำเภอเมือง จังหวัดแพร่

รับซื้อใบชานึ่งแล้วจากเกษตรกรรายย่อย (ใช้เวลานึ่ง 3 ชั่วโมง)

↓



เรียงเป็นชั้นใส่ในลางที่สานด้วยไม้ไผ่ภายในกรุด้วยถุงพลาสติก

↓

ใส่จนเกิบเต็มฉีดด้วยน้ำให้ท่วมใบชาเล็กน้อย

โรยเกลือเม็ดให้ทั่ว

↓

ปิดด้วยพลาสติก

ทับด้านบนด้วยของหนัก

↓

หมักที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 3 เดือน

หลังจากนั้นปิดทับด้วยใบไม้

หมักต่อจนครบ 6 เดือนนานถึง 1 ปี

↓

เป็นผลิตภัณฑ์เมี่ยงรอการจำหน่าย

ภาพ 7 ขั้นตอนการผลิตชาเมี่ยงของเกษตรกร บ้านป่าแดด ตำบลช่อแฮ อำเภอเมือง จังหวัดแพร่

จากภาพ 6 และ 7 พบว่ากระบวนการหมักเมี่ยงในจังหวัดน่านและจังหวัดแพร่มีความแตกต่างกันในกระบวกการนึ่งใบชาก่อนการหมักโดยจังหวัดน่านใช้เวลาในการนึ่ง 40 - 50 นาที ส่วนในจังหวัดแพร่ใช้เวลาในการนึ่งนานถึง 3 ชั่วโมง

4.2 ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิและเวลาต่อคุณภาพของใบชาอบแห้ง และคุณภาพน้ำชา

อิทธิพลของอุณหภูมิและเวลาต่อคุณภาพใบชาอบแห้งโดยทำการเปรียบเทียบกับวิธีการผลิตแบบดั้งเดิม จากนั้นวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านจุลชีพ ลักษณะทางกายภาพ เช่น สี กลิ่น รส การวิเคราะห์ด้านอนุมูลอิสระจากใบชา การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ดำเนินการดังนี้

ตาราง 1 องค์ประกอบทางเคมีของใบเมี่ยงหมัก

Period of fermented	Temperature (°C)	pH	Total acidity (%)	Moisture (%)	Aw^{ns}
1 day of stream	-	$5.62^{b}\pm0.10$	$0.18^{de}\pm0.00$	$70.33^{c}\pm1.03$	0.97±0.01
2 days of stream	-	$4.86^{c}\pm0.13$	$0.58^{a}\pm0.01$	$72.74^{bc}\pm1.02$	0.98±0.00
7 days of stream	-	$4.20^{d}\pm0.01$	$0.24^{c}\pm0.01$	$76.25^{b}\pm0.85$	0.98±0.01
0 day	40	$4.16^{d}\pm0.13$	$0.26^{c}\pm0.03$	$24.84^{d}\pm0.67$	0.97±0.01
	60	$4.15^{d}\pm0.03$	$0.26^{c}\pm0.03$	$25.56^{d}\pm0.83$	0.96±0.01
	80	$3.82^{e}\pm0.05$	$0.31^{b}\pm0.22$	$23.26^{e}\pm0.99$	0.96±0.01
7 days	40	$3.58^{f}\pm0.32$	$0.33^{b}\pm0.04$	$27.50^{d}\pm1.10$	0.97±0.01
	60	$3.76^{e}\pm0.08$	$0.35^{b}\pm0.02$	$26.05^{d}\pm1.33$	0.97±0.01
	80	$4.12^{d}\pm0.21$	$0.23^{c}\pm0.33$	$22.55^{d}\pm1.07$	0.96±0.04
14 days	40	$2.73^{h}\pm0.14$	$0.31^{b}\pm0.79$	$80.65^{a}\pm0.65$	0.94±0.03
	60	$3.57^{f}\pm0.90$	$0.25^{c}\pm0.93$	$89.02^{a}\pm1.18$	0.94±0.01
	80	$2.90^{h}\pm0.17$	$0.32^{b}\pm0.81$	$73.37^{bc}\pm0.57$	0.96±0.07
21 days	40	$3.31^{g}\pm0.27$	$0.27^{bc}\pm0.87$	$72.59^{bc}\pm0.31$	0.95±0.02
	60	$2.98^{h}\pm0.20$	$0.25^{c}\pm0.04$	$73.89^{b}\pm1.10$	0.96±0.01
	80	$3.38^{g}\pm0.22$	$0.19^{d}\pm0.31$	$71.99^{c}\pm0.94$	0.96±0.01
35 days	40	$2.87^{h}\pm0.30$	$0.25^{c}\pm0.53$	$76.49^{b}\pm1.06$	0.95±0.07
	60	$3.21^{g}\pm0.36$	$0.23^{c}\pm0.08$	$75.15^{b}\pm0.53$	0.95±0.01

Period of fermented	Temperature (^{o}C)	pH	Total acidity (%)	Moisture (%)	Aw^{ns}
	80	2.64^{h}±0.15	0.41^{b}±0.03	72.42^{bc}±1.43	0.95±0.02
63 days	40	4.77^{c}±0.07	0.86^{a}±0.24	76.20^{b}±1.47	0.95±0.03
	60	3.22^{g}±0.32	0.20^{d}±0.01	75.51^{b}±1.44	0.94±0.05
	80	2.65^{h}±0.19	0.32^{b}±0.07	73.63^{c}±0.28	0.95±0.01
6 months	-	6.56^{a}±0.31	0.15^{e}±0.02	20.06^{e}±0.86	0.97±0.01

ปริมาณองค์ประกอบทางเคมีในเมี่ยงที่ผ่านการนึ่งเป็นเวลา 7 วัน และทำการหมักเป็นเวลานาน 6 เดือน แสดงดังตาราง 1 พบว่า ปัจจัยที่ศึกษาคือระยะเวลาของการหมักและอุณหภูมิของการนึ่งที่ระกับ 40 60 และ 80 องศาเซลเซียส มีผลต่อค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ปริมาณกรดทั้งหมด และประมาณความชื้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ปริมาณกรด-ด่างของเมี่ยงมีค่าระหว่าง 2.64-6.56 ปริมาณกรดทั้งหมด มีค่าระหว่าง 0.15-0.86% และปริมาณความชื้นมีค่าระหว่าง 20.06-89.02%

ตาราง 2 ค่าสี L* a* b* ใบเมี่ยงหมัก

Period of fermented	Tem-perature (^{o}C)	L*	a*	b*
1 day of stream	-	30.64^{a}±1.68	4.97^{a}±0.83	18.40^{abc}±0.51
2 days of stream	-	28.77^{abcd}±1.50	3.89^{bc}±1.01	17.48^{bc}±0.96
7 days of stream	-	27.24^{bcd}±1.37	4.09^{b}±0.32	19.64^{ab}±0.03
0 day	40	26.17^{d}±1.13	2.79^{de}±0.16	15.93^{d}±0.34
	60	29.58^{ab}±1.79	3.52^{bc}±0.32	19.62^{ab}±0.97
	80	31.53^{a}±1.97	2.91^{de}±0.72	19.59^{ab}±0.40
7 days	40	28.91^{abc}±1.89	2.54^{e}±0.19	16.43^{c}±1.13
	60	28.44^{abcd}±0.67	2.86^{de}±0.59	16.32^{c}±0.44
	80	31.15^{a}±1.97	2.57^{e}±0.06	16.34^{c}±0.47
14 days	40	27.99^{bcd}±1.25	3.63^{cd}±0.61	22.75^{a}±0.28
	60	25.77^{d}±0.71	3.60^{cd}±0.57	15.94^{c}±0.02
	80	29.01^{abc}±1.10	3.44^{cd}±0.45	20.82^{ab}±0.69

Period of fermented	Tem-perature (°C)	L*	a*	b*
21 days	40	27.97^{bcd}±1.27	2.84^{de}±0.25	17.95^{bc}±0.58
	60	28.49^{abcd}±1.20	3.26^{de}±0.52	16.82^{c}±0.13
	80	28.29^{abcd}±1.24	4.45^{a}±0.33	18.82^{abc}±0.96
35 days	40	25.40^{d}±0.94	3.57^{bc}±0.01	14.61^{c}±0.15
	60	29.78^{a}±0.01	4.98^{a}±0.58	19.93^{ab}±0.94
	80	24.95^{d}±0.17	3.98^{bc}±0.01	15.74^{c}±0.49
63 days	40	24.63^{d}±0.89	3.29^{de}±0.28	16.20^{c}±0.88
	60	27.13^{bcd}±0.75	3.80^{bc}±0.03	18.28^{abc}±0.12
	80	26.75^{bcd}±0.54	5.40^{a}±0.05	16.73^{c}±0.47
6 months	-	27.76^{bcd}±1.41	5.34^{a}±0.51	19.89^{ab}±0.28

ตาราง 3 แสดงปริมาณ DPPH radical scavenging activity FRAP ABTS และ Total phenolic content

Period of fermented	Tem-perature (°C)	DPPH radical scavenging activity (mmol TE/g sample)	FRAP (mmolFe^{2+}/g sample)	ABTS	Total polyphenols (mg/100g sample)
1 day of stream	-	5.04^{bc}±0.80	10.69^{c}±0.63	8.66^{b}±0.18	5.07^{bc}±0.23
2 days of stream	-	7.06^{b}±0.16	15.87^{a}±0.95	12.61^{a}±0.80	5.93^{a}±0.54
7 days of stream	-	6.97^{b}±0.07	14.82^{ab}±0.10	9.73^{b}±0.48	6.09^{a}±0.78
0 day	40	7.95^{b}±0.42	13.56^{ab}±0.72	10.03^{ab}±0.27	5.51^{ab}±0.99
	60	7.53^{b}±0.42	12.14^{bc}±0.23	10.04^{ab}±0.24	4.01^{c}±0.51
	80	7.18^{b}±0.15	11.83^{bc}±0.38	11.68^{ab}±0.24	4.10^{c}±0.35
7 days	40	9.26^{a}±0.67	14.31^{ab}±0.71	9.52^{b}±0.38	5.16^{bc}±0.23
	60	10.62^{a}±0.88	15.43^{a}±0.13	10.12^{b}±0.79	4.97^{bc}±0.31
	80	8.76^{b}±0.41	11.93^{bc}±0.23	8.55^{b}±0.08	4.38^{c}±0.35
14 days	40	4.16^{bc}±0.88	8.15^{c}±0.42	8.31^{b}±0.46	3.72^{c}±0.53
	60	3.28^{c}±0.53	14.78^{ab}±0.56	12.92^{a}±0.53	5.44^{ab}±0.47

Period of fermented	Tem-perature (^{o}C)	DPPH radical scavenging activity (mmol TE/g sample)	FRAP (mmolFe^{2+}/g sample)	ABTS	Total polyphenols (mg/100g sample)
	80	1.75^{d}±0.52	14.35^{ab}±0.53	11.57^{ab}±0.21	4.97^{bc}±0.43
21 days	40	5.92^{bc}±0.71	10.99^{c}±0.33	12.97^{a}±0.66	6.39^{a}±0.29
	60	5.05^{bc}±0.36	15.08^{a}±0.73	10.90^{ab}±0.72	5.59^{a}±0.54
	80	3.77^{c}±0.24	16.77^{a}±0.27	9.14^{b}±0.71	4.64^{bc}±0.34
35 days	40	3.28^{c}±0.28	11.30^{c}±0.24	8.97^{b}±0.42	4.20^{c}±0.20
	60	3.12^{c}±0.23	12.56^{bc}±0.79	8.71^{b}±0.36	4.27^{c}±0.51
	80	3.39^{c}±0.79	14.41^{bc}±0.13	10.16^{b}±0.95	5.14^{bc}±0.44
63 days	40	2.59^{c}±0.37	10.09^{c}±0.41	9.68^{b}±0.59	4.43^{c}±0.61
	60	2.37^{d}±0.28	8.42^{c}±0.67	9.93^{b}±0.18	4.88^{bc}±0.13
	80	2.42^{c}±0.14	13.40^{ab}±0.60	9.86^{b}±0.55	5.52^{ab}±0.80
6 months	-	2.89^{c}±0.59	3.78^{d}±0.27	3.90^{c}±0.66	1.69^{d}±0.16

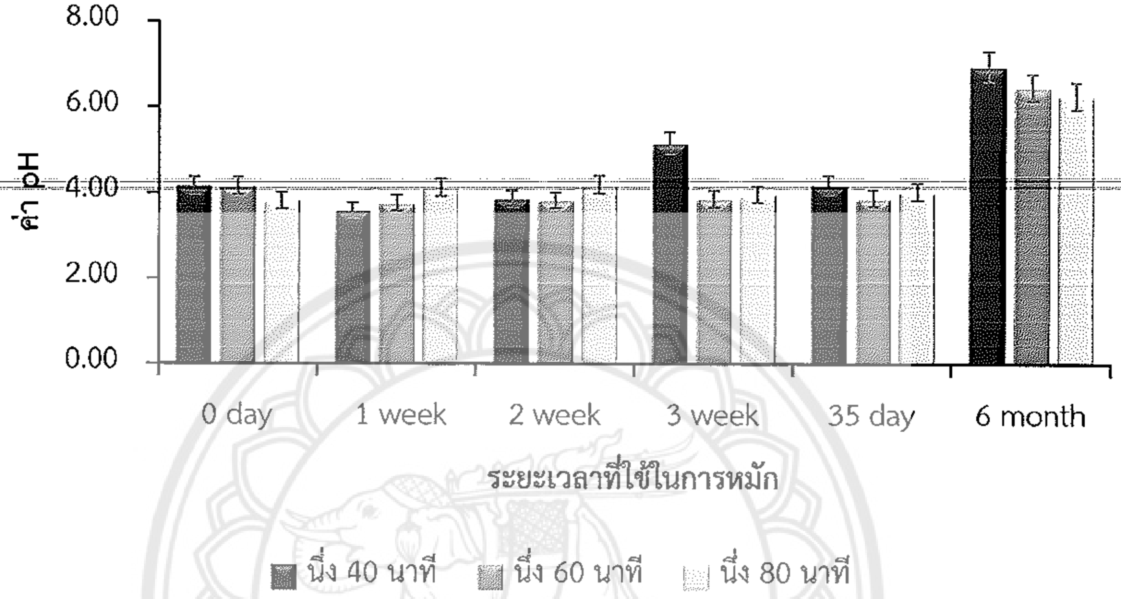
จากตาราง 3 พบว่า ระยะเวลาของการหมักเมี่ยงและอุณหภูมิที่ใช้ในการนึ่งเมี่ยงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้แก่ DPPH radical scavenging activity, FRAP, ABTS และปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด (Total polyphenols) แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

4.3 ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิและระยะเวลาการนึ่งใบชาเมี่ยงต่อการหมักและคุณภาพของเมี่ยงทางกายภาพ เคมี และจุลชีววิทยา

ศึกษาผลของปัจจัยทางด้านอุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้ในการนึ่งใบชาเมี่ยงที่มีผลต่อคุณภาพของเมี่ยง (เมี่ยงหมัก) โดยดำเนินการดังนี้

- **การวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ เคมี**

อิทธิพลของค่า pH ต่ออุณหภูมิและระยะเวลาการนึ่งใบชาเมี่ยงในกระบวนการผลิตชาใบเมี่ยง (เมี่ยงหมัก) ที่ผ่านการนึ่ง 40 นาที 60 นาที และ 80 นาที ดังภาพ 7



ภาพ 8 การเปลี่ยนแปลงค่า pH ของกระบวนการผลิตชาใบเมี่ยง (เมี่ยงหมัก)

จากภาพ 8 พบว่า pH ของกระบวนการผลิตชาใบเมี่ยง (เมี่ยงหมัก) นึ่งที่ 40 นาที เมื่อระยะเวลาการหมักนานขึ้นจะทำให้ค่า pH เพิ่มขึ้น สูงกว่าเมื่อเทียบกับระยะเวลาในการนึ่ง 60 และ 80 นาที ตามลำดับ

– **การวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยา**

ดำเนินการดังนี้ วิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วยเทคนิค pour plate ในอาหาร standard plate count วิเคราะห์จำนวน Bile salt resistant LAB ในอาหาร MRS agar ที่เติม oxgall 0.15% ด้วยเทคนิค pour plate วิเคราะห์ราและยีสต์ในอาหาร Rose Bengal agar ด้วยเทคนิค spread plate ตามวิธีของ ISO 7218:2007 ผลการวิเคราะห์ดังตาราง 1

ตาราง 4 จำนวนจุลินทรีย์ในตัวอย่างเมี่ยง (ใบชาหมัก)

ตัวอย่าง		Total plate count (Log cfu/g)	Total lactic (Log cfu/g)	Total lactic+oxgall (Log cfu/g)	Yeast and mold (Log cfu/g)
จังหวัดน่าน					
	นึ่ง 40 นาที	6.68±0.60	5.47±0.51	6.27±0.53	7.28±0.91
เมี่ยง 0 วัน	นึ่ง 60 นาที	6.41±0.31	7.31±0.13	7.35±0.08	7.29±0.52
	นึ่ง 80 นาที	6.16±0.40	6.70±0.24	7.25±0.37	6.91±0.80
	นึ่ง 40 นาที	7.01±0.72	5.75±0.51	6.54±0.30	5.58±0.27
เมี่ยง 1 สัปดาห์	นึ่ง 60 นาที	7.30±0.44	6.65±0.85	6.92±1.07	5.77±0.22
	นึ่ง 80 นาที	6.77±1.02	6.88±0.14	6.35±0.29	5.53±0.22
	นึ่ง 40 นาที	7.31±0.26	5.54±0.25	6.36±0.61	7.59±0.24
เมี่ยง 2 สัปดาห์	นึ่ง 60 นาที	7.00±0.64	5.14±0.07	6.45±0.61	7.35±0.19
	นึ่ง 80 นาที	6.68±0.21	5.19±0.36	6.33±0.45	7.50±0.45
	นึ่ง 40 นาที	6.56±0.80	5.71±0.34	5.54±0.21	7.03±0.61
เมี่ยง 3 สัปดาห์	นึ่ง 60 นาที	5.87±0.34	5.32±0.33	5.10±0.40	6.79±0.57
	นึ่ง 80 นาที	5.51±0.24	5.28±0.28	5.08±0.06	6.60±0.17
	นึ่ง 40 นาที	5.15±0.12	5.63±0.21	5.13±0.13	6.31±0.41
เมี่ยง 5 สัปดาห์	นึ่ง 60 นาที	4.45±0.34	4.60±0.16	4.83±0.26	6.65±0.17
	นึ่ง 80 นาที	4.40±0.24	4.87±0.40	4.63±0.24	6.66±0.16
	นึ่ง 40 นาที	5.08±0.07	5.21±0.22	4.71±0.20	5.72±0.21
เมี่ยง 7 สัปดาห์	นึ่ง 60 นาที	4.08±0.41	4.10±0.06	4.45±0.53	5.66±0.32
	นึ่ง 80 นาที	3.39±0.38	4.08±0.07	3.43±0.31	5.60±0.17
เมี่ยง 9 สัปดาห์	นึ่ง 40 นาที	5.09±0.08	5.41±0.26	3.92±0.55	5.56±0.29

ตัวอย่าง	Total plate count (Log cfu/g)	Total lactic (Log cfu/g)	Total lactic+oxgall (Log cfu/g)	Yeast and mold (Log cfu/g)
นึ่ง 60 นาที	4.57±0.32	4.41±0.26	3.41±0.30	5.35±0.13
นึ่ง 80 นาที	3.44±0.36	4.09±0.30	3.45±0.23	5.50±0.25
นึ่งแล้ว 1 วัน	7.14±0.79	5.94±0.57	3.74±0.41	7.53±0.34
นึ่งแล้ว 2 วัน	7.20±0.47	6.11±0.53	4.95±0.91	7.99±0.17
หมัก 7 วัน	7.35±0.83	7.08±0.76	5.64±0.17	7.89±0.17
จังหวัดแพร่				
เมี่ยง 0 วัน	7.36±0.17	5.41±0.68	6.16±0.08	7.30±0.04
เมี่ยง 1 วัน	6.64±1.05	5.64±0.84	6.15±0.09	7.09±0.33
เมี่ยง 1 สัปดาห์	6.67±0.86	5.01±0.31	5.81±0.10	4.54±0.88
เมี่ยง 2 สัปดาห์	7.09±0.53	4.69±0.74	5.73±0.14	6.32±0.40
เมี่ยง 3 สัปดาห์	5.26±0.41	7.10±0.93	5.84±0.26	7.02±0.15
อำเภอเด่นชัย	5.33±0.45	3.19±1.07	3.81±0.77	5.55±0.14
บ้านป่าแดด ต.ช่อแฮ อ.เมือง	5.23±0.46	4.58±0.85	4.82±0.30	7.11±0.22

หมายเหตุ : LAB : Lactic acid bacteria

จากตาราง 4 พบว่า จำนวน Total plate count ในช่วง 3 สัปดาห์แรกมีค่าอยู่ระหว่าง Log5 – Log7 ผลิตภัณฑ์เมี่ยงสุดท้ายพร้อมบริโภคมีจำนวนจุลินทรีย์ลดลงเหลือประมาณ Log5 จำนวน Lactic acid bacteria ในช่วง 3 สัปดาห์แรกมีค่าอยู่ระหว่าง Log4 – Log7 ผลิตภัณฑ์เมี่ยงสุดท้ายพร้อมบริโภคมีจำนวนจุลินทรีย์ลดลงเหลือประมาณ Log3 – Log4 จำนวน Bile salt resistant LAB ในช่วง 3 สัปดาห์แรกมีค่าอยู่ระหว่าง Log5 – Log6 ผลิตภัณฑ์เมี่ยงสุดท้ายพร้อมบริโภคมีจำนวนจุลินทรีย์ลดลงเหลือประมาณ Log3 – Log4 จำนวน Yeast and mold ในช่วง 3 สัปดาห์แรกมีค่าอยู่ระหว่าง Log4 – Log7 ผลิตภัณฑ์เมี่ยงสุดท้ายพร้อมบริโภคมีจำนวนจุลินทรีย์ลดลงเหลือประมาณ Log5 – Log

ตาราง 5 แสดงคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีบางประการของเชื้อ Lactic acid bacteria (ใบชาหมัก)

คุณสมบัติ	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7
Gram form	+	+	+	+	+	+	+
Cell shape	C	R	R	R	R	R	R
Catalase	-	-	-	-	-	-	-
Oxidase	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
No_3 reduction	-	-	-	-	-	-	-
Esculin hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+
Arginine hydrolysis	-	-	-	-	-	-	-
Starch hydrolysis	-	-	-	+	+	+	+
Grownth in 4% NaCl	+	+	+	+	+	+	+
Grownth in 9% NaCl	+	+	+	+	+	+	+
Grownth in 11% NaCl	-	-	-	-	-	-	-
Grownth 45 ^{0}C	+	+	+	+	+	+	+
Grownth 37 ^{0}C	+	+	+	+	+	+	+
Grownth 15 ^{0}C	-	-	-	-	-	-	-
0.1% Bile salt resistant	+	+	+	+	+	+	+
Fermentation	+	-	+	-	-	-	-
Acid production from glucose	+/g	+/g	+/g	+/g	+/g	+/g	+/g
D-Amygdalin	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabinose	+/g	+	+	+	-	+	+
Fructose	+	+/g	+/g	+/g	+/g	+/g	+
Lactose	+/g	+	-	+	-	-	+
Maltose	+/g	+/g	-	+/g	+	+/g	+/g
D-mannitol	+	-	-	+	-	+	+
D-melibiose	+	+/g	-	+	-	+/g	+/g
Raffinrose	+	+	-	+/g	-	+/g	+
D-Ribose	+	+	+	+/g	+/g	+/g	+/g

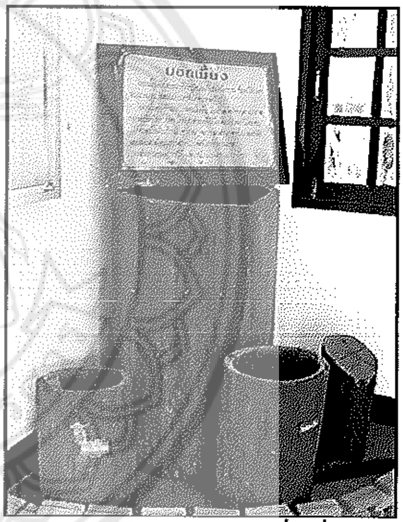
คุณสมบัติ	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7
Sucrose	+	+	-	+	+	+	+
D-Trehalose	+	+/g	-	+/g	-	+/g	+/g
D-Xylose	+	+/g	+/g	+/g	+/g	+/g	+/g

<u>ระยะที่ 2</u>

การดำเนินการยกระดับมาตรฐานการผลิตใบชาเมี่ยงในพื้นที่ จังหวัดน่าน ให้เข้าสู่มาตรฐานการผลิตการปฏิบัติที่ดีในการผลิตอาหาร (GMP)

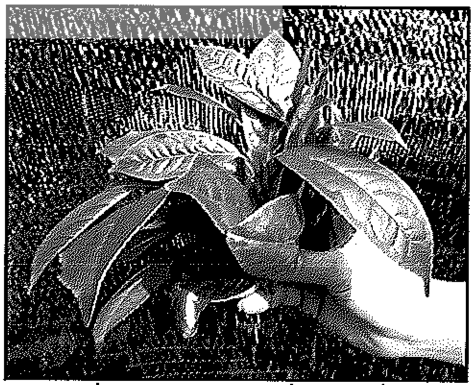
1. สำรวจและวิเคราะห์กระบวนการผลิตชาใบเมี่ยงและผลิตภัณฑ์ชาใบเมี่ยง เพื่อจัดทำระบบการผลิตตามหลักปฏิบัติการผลิตที่ดีในการผลิตอาหาร (GMP)" ให้แก่ผู้ผลิต ดังภาพ 10 ถึง 19

ภาพ 10 ชาเมี่ยง (ชาป่า) หรือ ชาอัสสัม



ภาพ 11 ลักษณะบอกนึ่งเมี่ยง

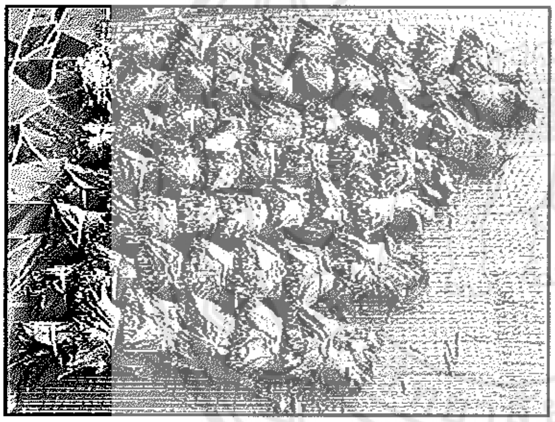
ภาพ 12 อุปกรณ์ในการเก็บใบเมี่ยงสด



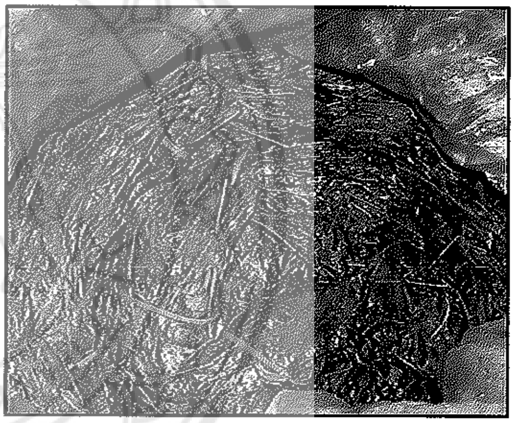
ภาพที่ 13 ลักษณะใบเมี่ยง (ใบที่ 4-6)

ภาพ 14 การเรียงใบเมี่ยงสดในบอกนึ่งเมี่ยง

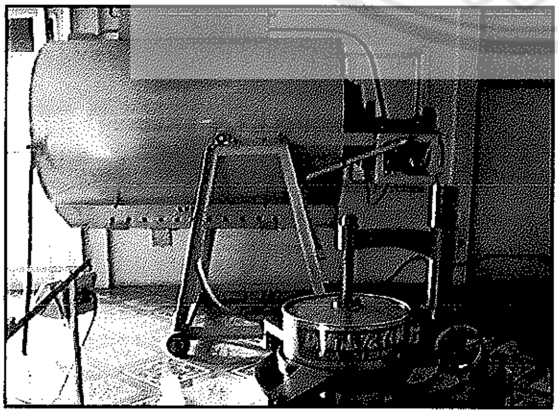
ภาพ 15 การนึ่งเมี่ยง



ภาพ 16 ลักษณะเมี่ยงนึ่ง



ภาพ 17 ลักษณะเมี่ยงหมัก

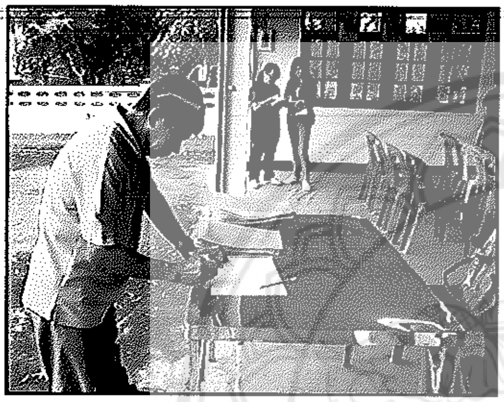


ภาพ 18 อุปกณ์การผลิตผลิตภัณฑ์จากชาเมี่ยง

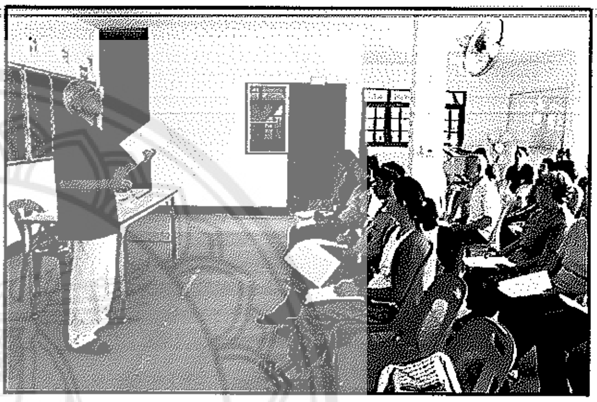
ภาพ 19 ห้องบรรจุผลิตภัณฑ์จากชาเมี่ยง

2. จัดอบรมให้ความรู้ก่อนการจัดทำระบบ GMP และภายหลังการจัดทำระบบ GMP ดำเนินการติดตามผลการจัดทำระบบ GMP กับกลุ่มผู้ผลิตที่เข้าร่วมจัดทำระบบโดยความสมัครใจ และติดต่อประสานงานหน่วยงานที่ให้การรับรองมาตรฐาน GMP เพื่อขอการรับรองระบบมาตรฐานการผลิต

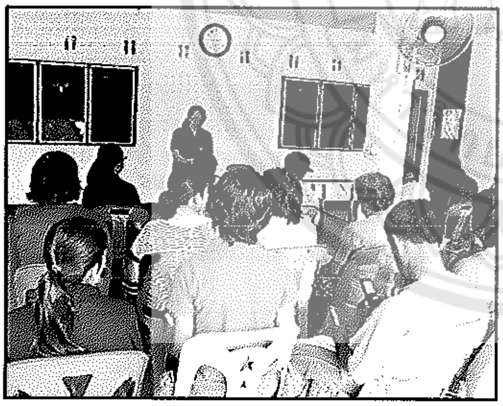
ภาพอบรมให้ความรู้ เรื่อง หลักปฏิบัติที่ดีในการผลิต ผลิตภัณฑ์ชาและเมี่ยง วันที่ 16 กรกฎาคม 2560 เวลา 08.00 – 16.30 น. ณ วิสาหกิจชุมชนกลุ่มผลิตภัณฑ์ชา และส่งเสริมการท่องเที่ยวเชิงนิเวศน์ศรีนาป่าน – ตาแวน อำเภอเมือง จังหวัดน่าน ดังภาพ 20 ถึง 23



ภาพ 20 การลงทะเบียนอบรม



ภาพ 21 วิทยากรบรรยาย



ภาพ 22 วิทยากรบรรยาย

ภาพ 23 ทำแบบสอบถาม

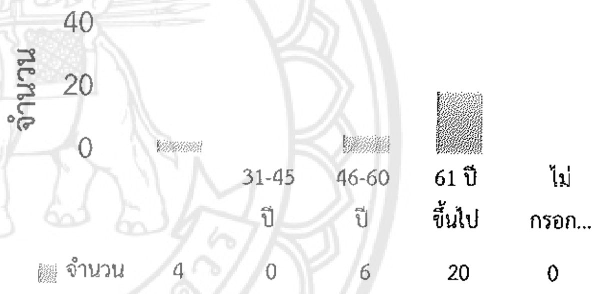
สรุปผลการสำรวจข้อมูลผู้เข้าร่วมโครงการฝึกอบรม เรื่อง “หลักปฏิบัติที่ดีในการผลิต ผลิตภัณฑ์ชาและเมี่ยง” วันที่ 16 กรกฎาคม 2560 เวลา 08.00 – 16.30 น. ณ วิสาหกิจชุมชนกลุ่มผลิตภัณฑ์ชา และส่งเสริมการท่องเที่ยวเชิงนิเวศน์ ศรีนาป่าน – ตาแวน อำเภอเมือง จังหวัดน่าน

จากแบบสอบถามจำนวน 30 ชุดที่ทำการสำรวจมีผู้ตอบแบบสอบถามกลับมาทั้งหมด 30 ชุด ซึ่งสรุปได้ดังต่อไปนี้

<u>ตอนที่ 1 ข้อมูลทั่วไป</u>

เกี่ยวกับผู้เข้าร่วมอบรมเรื่อง “หลักปฏิบัติที่ดีในการผลิต ผลิตภัณฑ์ชาและเมี่ยง” มีผู้ตอบแบบสอบถามจำนวน 30 ชุด แยกเป็นเพศชาย 5 ราย และเพศหญิง 25 ราย โดยผู้เข้าร่วมอบรมร้อยละ 13 อายุไม่เกิน 30 ปี ร้อยละ 20 อายุระหว่าง 46 – 60 ปี ร้อยละ 67 อายุ 61 ปีขึ้นไป ร้อยละ 10 เป็นผู้ประกอบการ ร้อยละ 83 เป็นเกษตรกร ร้อยละ 7 เป็นผู้สนใจทั่วไป ร้อยละ 80 วุฒิการศึกษาต่ำกว่าปริญญาตรี ร้อยละ 20 วุฒิการศึกษาปริญญาตรี ดังแผนภาพที่ 1

ก) แผนภาพจำนวนผู้ร่วมอบรมแบ่งตามเพศ



ข) แผนภาพจำนวนผู้ร่วมอบรมแบ่งตามอายุ

ค) แผนภาพจำนวนผู้ร่วมอบรมแบ่งตามสถานภาพ

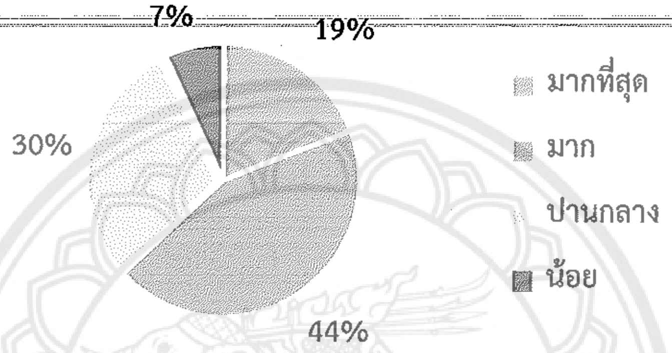
ง) แผนภาพจำนวนผู้ร่วมอบรมแบ่งตามวุฒิการศึกษา

แผนภาพแสดงการกระจายจำนวนของผู้เข้าร่วมอบรมตามเพศ (ก) อายุ (ข) สถานภาพ (ค) วุฒิการศึกษา (ง)

ตอนที่ 2 ความคิดเห็นของผู้ร่วมอบรมครั้งนี้

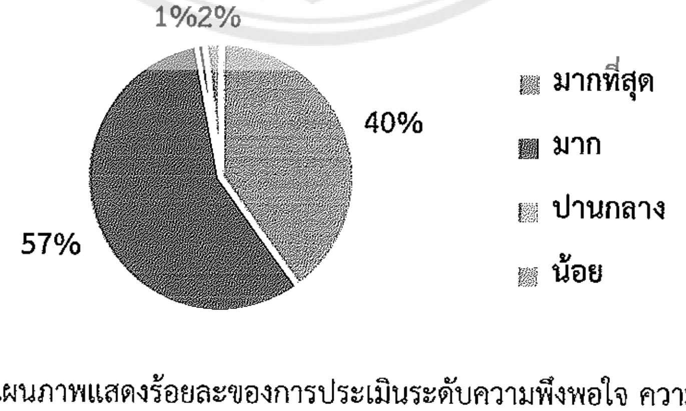
2.1 การประเมินความคิดเห็นของผู้เข้าร่วมอบรมภาคดำเนินการเรื่อง "หลักปฏิบัติที่ดีในการผลิต ผลิตภัณฑ์ชาและเมี่ยง"

การประเมินระดับความพึงพอใจในด้านการดำเนินงานโครงการอบรม หลักปฏิบัติที่ดีในการผลิต ผลิตภัณฑ์ชาและเมี่ยง ของผู้อบรมพบว่า การประชาสัมพันธ์โครงการฯ มีความพึงพอใจมากที่สุดร้อยละ 19 มีความพึงพอใจระดับมากร้อยละ 44 มีความพึงพอใจระดับปานกลางร้อยละ 30 มีความพึงพอใจระดับน้อย ร้อยละ 7



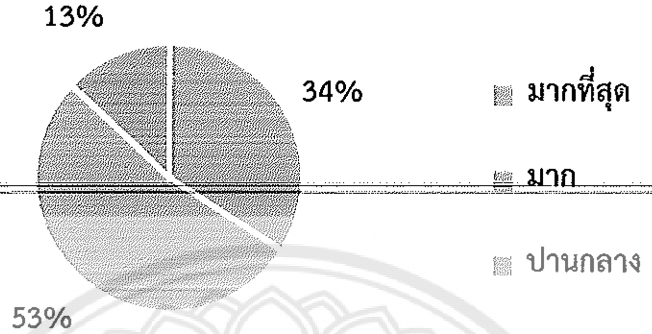
ภาพที่ 24 แผนภาพแสดงร้อยละของการประเมินระดับความพึงพอใจการประชาสัมพันธ์โครงการอบรมหลักปฏิบัติที่ดีในการผลิต ผลิตภัณฑ์ชาและเมี่ยง

การประเมินระดับความพึงพอใจในด้านการดำเนินงานโครงการอบรมหลักปฏิบัติที่ดีในการผลิต ผลิตภัณฑ์ชาและเมี่ยง ของผู้อบรมพบว่า ความเหมาะสมของสถานที่การจัดอบรม มีความพึงพอใจมากที่สุด ร้อยละ 40 มีความพึงพอใจระดับมากร้อยละ 57 มีความพึงพอใจระดับปานกลางร้อยละ 1 มีความพึงพอใจระดับน้อยร้อยละ 2



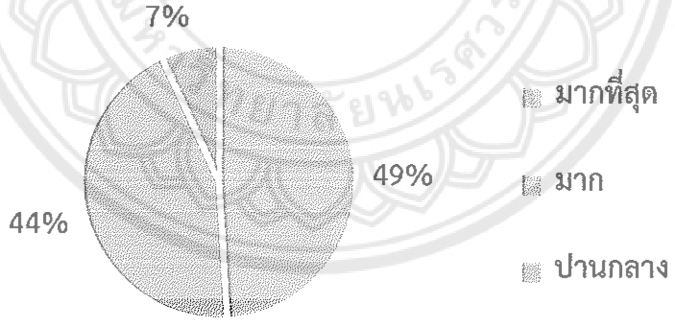
ภาพที่ 25 แผนภาพแสดงร้อยละของการประเมินระดับความพึงพอใจ ความเหมาะสมของสถานที่การจัดอบรมหลักปฏิบัติที่ดีในการผลิต ผลิตภัณฑ์ชาและเมี่ยง

การประเมินระดับความพึงพอใจในด้านการดำเนินงานโครงการอบรมการถ่ายทอดความรู้ หลักปฏิบัติที่ดีในการผลิต ผลิตภัณฑ์ชาและเมี่ยง ของผู้อบรมพบว่า ความเหมาะสมของรูปแบบการจัดการในการลงทะเบียนมีความพึงพอใจมากที่สุดร้อยละ 34 มีความพึงพอใจระดับมากร้อยละ 53 มีความพึงพอใจระดับปานกลางร้อยละ 13



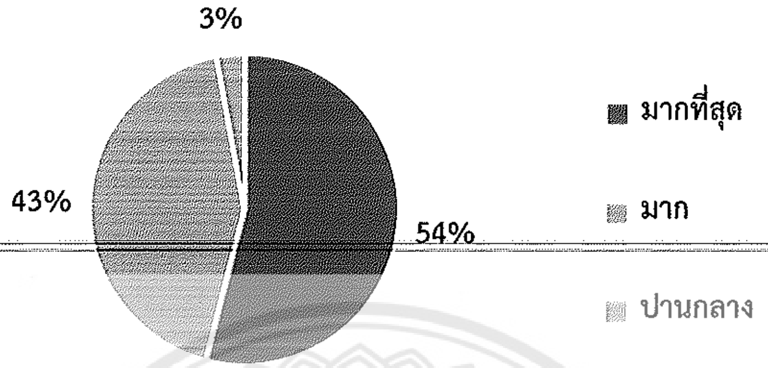
ภาพที่ 26 แผนภาพแสดงร้อยละของการประเมินระดับความพึงพอใจ ความเหมาะสมของรูปแบบการจัดการในการลงทะเบียน หลักปฏิบัติที่ดีในการผลิต ผลิตภัณฑ์ชาและเมี่ยง

การประเมินระดับความพึงพอใจในด้านการดำเนินงานโครงการอบรมหลักปฏิบัติที่ดีในการผลิต ผลิตภัณฑ์ชาและเมี่ยง ของผู้อบรมพบว่า เอกสารประกอบโครงการ มีความพึงพอใจมากที่สุดร้อยละ 49 มีความพึงพอใจระดับมากร้อยละ 44 มีความพึงพอใจระดับปานกลางร้อยละ 7



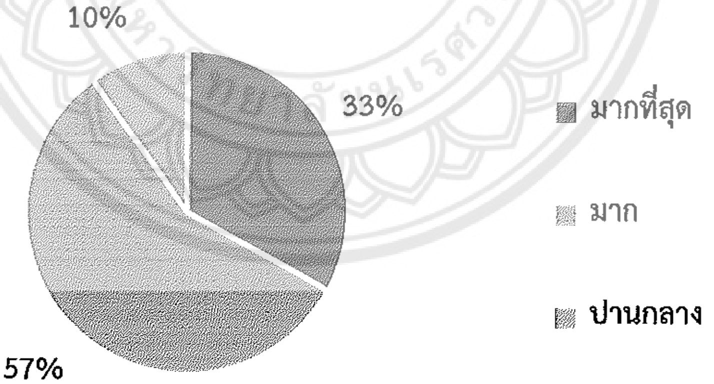
ภาพที่ 27 แผนภาพแสดงร้อยละของการประเมินระดับความพึงพอใจ เอกสารประกอบโครงการอบรมหลักปฏิบัติที่ดีในการผลิต ผลิตภัณฑ์ชาและเมี่ยง

การประเมินระดับความพึงพอใจในด้านการดำเนินงานโครงการอบรมหลักปฏิบัติที่ดีในการผลิต ผลิตภัณฑ์ชาและเมี่ยง ของผู้อบรมพบว่า การอำนวยความสะดวกของเจ้าหน้าที่ มีความพึงพอใจมากที่สุด ร้อยละ 54 มีความพึงพอใจระดับมากร้อยละ 43 มีความพึงพอใจระดับปานกลางร้อยละ 3



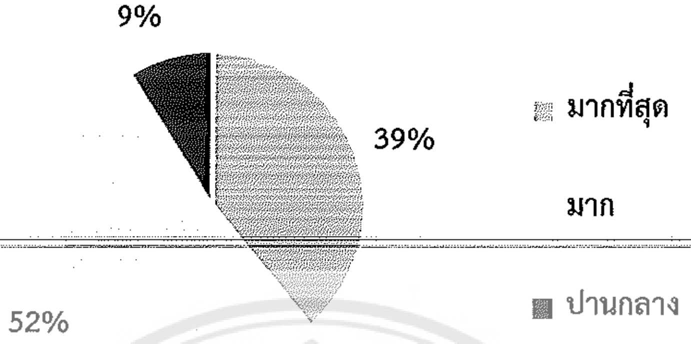
ภาพที่ 28 แผนภาพแสดงร้อยละของการประเมินระดับความพึงพอใจ การอำนวยความสะดวกของเจ้าหน้าที่ของโครงการอบรมหลักปฏิบัติที่ดีในการผลิต ผลิตภัณฑ์ชาและเมี่ยง

การประเมินระดับความพึงพอใจในด้านการดำเนินงานโครงการอบรมหลักปฏิบัติที่ดีในการผลิต ผลิตภัณฑ์ชาและเมี่ยง ของผู้อบรมพบว่า ความเหมาะสมของระยะเวลาของการจัดอบรม มีความพึงพอใจมากที่สุดร้อยละ 33 มีความพึงพอใจระดับมากร้อยละ 57 มีความพึงพอใจระดับปานกลางร้อยละ 10



ภาพที่ 29 แผนภาพแสดงร้อยละของการประเมินระดับความพึงพอใจ ความเหมาะสมของระยะเวลาของการจัดอบรมหลักปฏิบัติที่ดีในการผลิต ผลิตภัณฑ์ชาและเมี่ยง

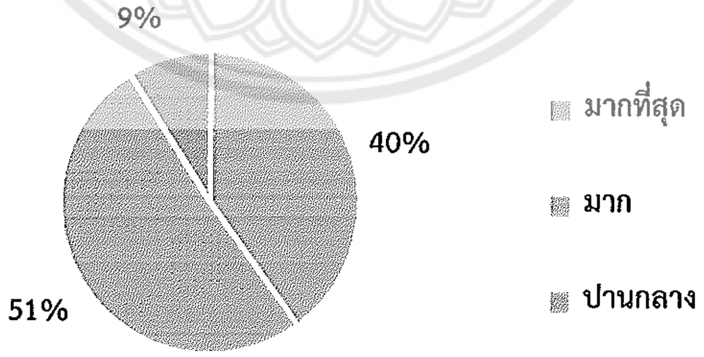
การประเมินระดับความพึงพอใจในด้านการดำเนินงานโครงการอบรมหลักปฏิบัติที่ดีในการผลิต ผลิตภัณฑ์ชาและเมี่ยง ของผู้อบรมพบว่า อาหารและเครื่องดื่ม มีความพึงพอใจมากที่สุดร้อยละ 39 มีความพึงพอใจระดับมากร้อยละ 52 มีความพึงพอใจระดับปานกลางร้อยละ 9



ภาพที่ 30 แผนภาพแสดงร้อยละของการประเมินระดับความพึงพอใจ อาหารและเครื่องดื่มของโครงการอบรมหลักปฏิบัติที่ดีในการผลิต ผลิตภัณฑ์ชาและเมี่ยง

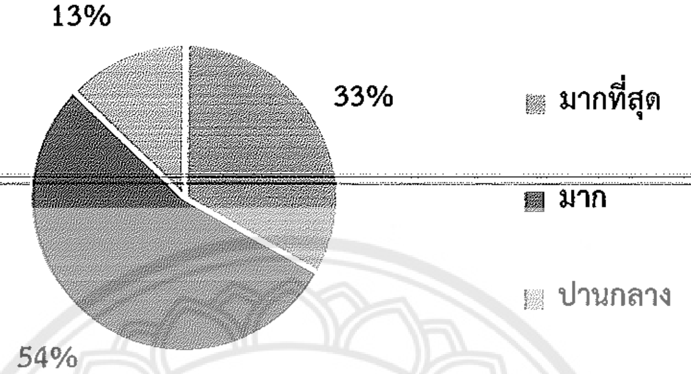
2.2 การประเมินความคิดเห็นของผู้เข้าร่วมอบรมภาคการบรรยาย โครงการอบรมหลักปฏิบัติที่ดีในการผลิต ผลิตภัณฑ์ชาและเมี่ยง

การประเมินระดับความพึงพอใจในด้านการดำเนินงานโครงการอบรมหลักปฏิบัติที่ดีในการผลิต ผลิตภัณฑ์ชาและเมี่ยง ของผู้อบรมพบว่า มีความเข้าใจเข้าใจเกี่ยวกับการผลิตชา – เมี่ยง ให้มีคุณภาพดีและปลอดภัยต่อผู้บริโภค มีความพึงพอใจมากที่สุดร้อยละ 40 มีความพึงพอใจระดับมากร้อยละ 51 มีความพึงพอใจระดับปานกลางร้อยละ 9



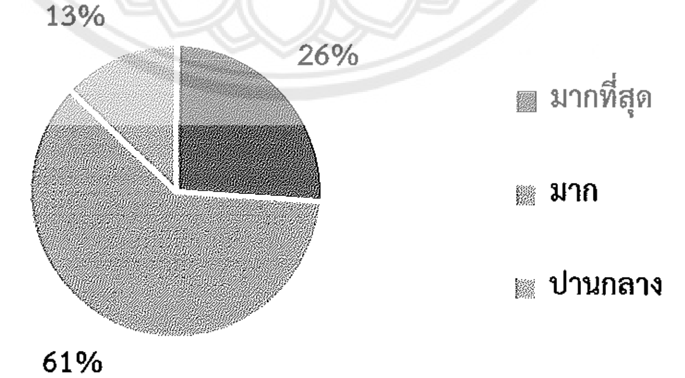
ภาพที่ 31 แผนภาพแสดงร้อยละของการประเมินระดับความพึงพอใจ มีความเข้าใจเข้าใจเกี่ยวกับการผลิตชา – เมี่ยง ให้มีคุณภาพดีและปลอดภัยต่อผู้บริโภค โครงการอบรมหลักปฏิบัติที่ดีในการผลิต ผลิตภัณฑ์ชาและเมี่ยง

การประเมินระดับความพึงพอใจในด้านการดำเนินงานโครงการอบรมหลักปฏิบัติที่ดีในการผลิต ผลิตภัณฑ์ชาและเมี่ยง ของผู้อบรมพบว่า ผู้เข้าร่วมอบรมได้รับความรู้ความเข้าใจในหลักการปฏิบัติที่ดีในการผลิตอาหาร (จีเอ็มพี.) มากน้อยเพียงใด มีความพึงพอใจมากที่สุดร้อยละ 33 มีความพึงพอใจระดับมาก ร้อยละ 54 มีความพึงพอใจระดับปานกลางร้อยละ 13



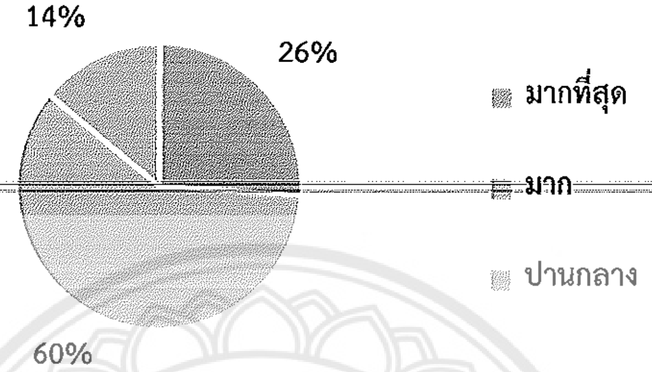
ภาพที่ 32 แผนภาพแสดงร้อยละของการประเมินระดับความพึงพอใจผู้เข้าร่วมอบรมได้รับความรู้ความเข้าใจในหลักการปฏิบัติที่ดีในการผลิตอาหาร (จีเอ็มพี.) มากน้อยเพียงใด โครงการอบรมหลักปฏิบัติที่ดีในการผลิต ผลิตภัณฑ์ชาและเมี่ยง

การประเมินระดับความพึงพอใจในด้านการดำเนินงานโครงการอบรมหลักปฏิบัติที่ดีในการผลิต ผลิตภัณฑ์ชาและเมี่ยง ของผู้อบรมพบว่า ท่านสามารถนำความรู้ที่ได้ไปพัฒนาการผลิตชา – เมี่ยง ของตนเองได้มากน้อยเพียงใด มีความพึงพอใจมากที่สุดร้อยละ 26 มีความพึงพอใจระดับมากร้อยละ 61 มีความพึงพอใจระดับปานกลางร้อยละ 13



ภาพที่ 33 แผนภาพแสดงร้อยละของการประเมินระดับความพึงพอใจ ผู้เข้าอบรมท่านสามารถนำความรู้ที่ได้ไปพัฒนาการผลิตชา – เมี่ยง ของตนเองได้มากน้อยเพียงใด โครงการอบรมหลักปฏิบัติที่ดีในการผลิต ผลิตภัณฑ์ชาและเมี่ยง

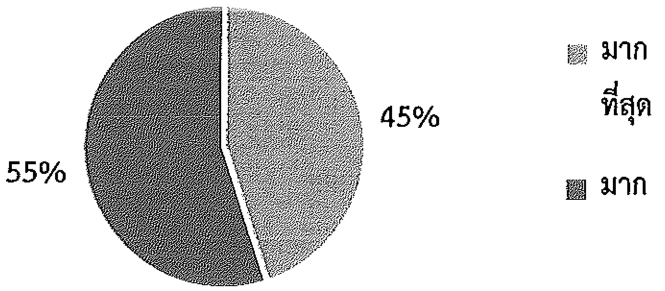
การประเมินระดับความพึงพอใจในด้านการดำเนินงานโครงการอบรม หลักปฏิบัติที่ดีในการผลิต ผลิตภัณฑ์ชาและเมี่ยง ของผู้อบรมพบว่า ท่านสามารถนำความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นได้มากน้อยเพียงใด มีความพึงพอใจมากที่สุดร้อยละ 26 มีความพึงพอใจระดับมากร้อยละ 60 มีความพึงพอใจระดับปานกลางร้อยละ 14



ภาพที่ 34 แผนภาพแสดงร้อยละของการประเมินระดับความพึงพอใจ ท่านสามารถนำความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นได้มากน้อยเพียงใด โครงการอบรม หลักปฏิบัติที่ดีในการผลิต ผลิตภัณฑ์ชาและเมี่ยง

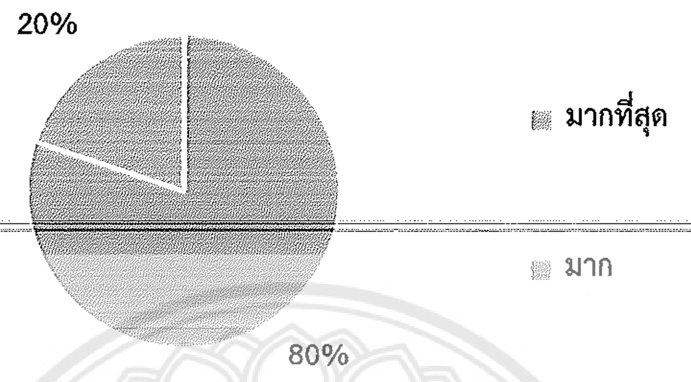
2.3 การประเมินความคิดเห็นของผู้เข้าร่วมการถ่ายทอดความรู้ด้านความพึงพอใจต่อการจัดอบรมโครงการอบรมหลักปฏิบัติที่ดีในการผลิต ผลิตภัณฑ์ชาและเมี่ยง

การประเมินระดับความพึงพอใจในด้านการดำเนินงานโครงการอบรม หลักปฏิบัติที่ดีในการผลิต ผลิตภัณฑ์ชาและเมี่ยง ของผู้อบรมพบว่า มีความพึงพอใจโดยรวมต่อการจัดอบรมโครงการฯ นี้มากน้อยเพียงใด มีความพึงพอใจมากที่สุดร้อยละ 45 มีความพึงพอใจระดับมากร้อยละ 55



ภาพที่ 35 แผนภาพแสดงร้อยละของการประเมินระดับความพึงพอใจ มีความพึงพอใจโดยรวมต่อวิทยากรมากน้อยเพียงใด โครงการอบรมหลักปฏิบัติที่ดีในการผลิต ผลิตภัณฑ์ชาและเมี่ยง

การประเมินระดับความพึงพอใจในด้านการดำเนินงานโครงการอบรมหลักปฏิบัติที่ดีในการผลิตผลิตภัณฑ์ชาและเมี่ยง ของผู้อบรมพบว่า มีความพึงพอใจโดยรวมต่อวิทยากรมากน้อยเพียงใด มีความพึงพอใจมากที่สุดร้อยละ 80 มีความพึงพอใจระดับมากร้อยละ 20



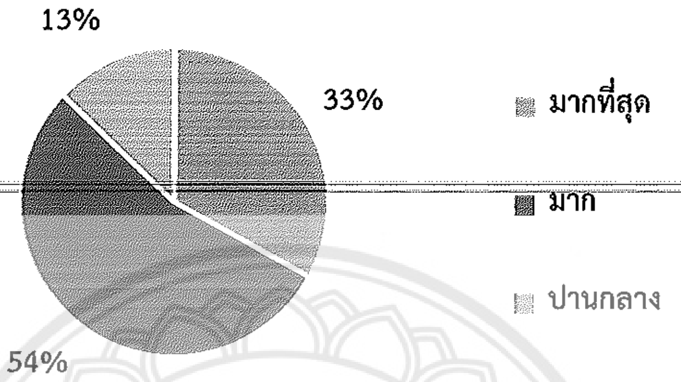
ภาพที่ 36 แผนภาพแสดงร้อยละของการประเมินระดับความพึงพอใจ มีความพึงพอใจโดยรวมต่อวิทยากรมากน้อยเพียงใด โครงการอบรมหลักปฏิบัติที่ดีในการผลิต ผลิตภัณฑ์ชาและเมี่ยง

บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ชาอัสสัม (*Camellia sinensis* var. *assamica*) คือ ชาพื้นเมืองที่ขึ้นตามป่า ลักษณะเป็นลำต้นเดี่ยว สูงประมาณ 6-18 เมตร มีใบใหญ่ เจริญเติบโตได้เร็ว เป็นไม้ยืนต้นขนาดใหญ่ (Van der Vossen and Wessel, 2000) องค์ประกอบที่สำคัญในชาประกอบด้วยสารโพลีฟีนอล (polyphenol) ร้อยละ 20-35 ซึ่งจะมีปริมาณลดลงเมื่อใบมีอายุมากขึ้น (Chu and Juneja, 1999) เป็นผลิตภัณฑ์ท้องถิ่นทางภาคเหนือของประเทศไทยหลายจังหวัด ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ จังหวัดเชียงราย จังหวัดน่าน จังหวัดแพร่ และจังหวัดอุตรดิตถ์ ลักษณะทั่วไปเป็นใบเดี่ยว ปลายแหลม ใบมีความกว้างประมาๆ 17-22 เซนติเมตร มีขั้นตอนโดยการนำใบชาสดมามัดเป็นกำ นึ่งแล้วหมักใส่เกลือและทิ้งไว้จนใบชาเปลี่ยนสภาพเป็นสีเหลือง เมื่อใบยุ่ย จึงจะสามารถนำบริโภคได้ นิยมใช้เป็นของขบเคี้ยวหรืออมเป็นของว่างระหว่างการทำงาน หรือชงดื่มกับน้ำร้อน ช่วยผ่อนคลายความเหน็ดเหนื่อย ปัจจุบันมีอยู่หลายชนิด เช่น เมี่ยงหวาน เมี่ยงเค็ม เมี่ยงหมี่ เมี่ยงขิง เมี่ยงใส่กระเทียมดอง ชาเมี่ยงเป็นแหล่งสำคัญของคาเทชิน (catechin) โดยมีปริมาณสูงถึง 30 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง อยู่ในกลุ่มฟีนอลซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชันที่มีคุณภาพสูง และยังพบ theaflavins, thearubigins ในชาเมี่ยงอีกด้วย (สุรัติวดี ภาคอุทัย, 2551) นอกจากนี้ยังมีรายงานตรวจพบ Lactic acid bacteria เช่น *pediococcus pentosaceus* และ *Lactobacillus plantarum* และ *Lactobacillus* sp. จากเมี่ยง (ใบชาหมัก) และอาหารหมักดองของไทย (Tanasupawat S. and Daengsubha W., 1983 ; Tanasupawat S. at al,1992) ซึ่งเชื้อ Lactic acid bacteria บางชนิดมีคุณสมบัติเป็นเชื้อ probiotic ซึ่งมีผลดีต่อสุขภาพของผู้บริโภคหลายประการ และยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ (Jay, Loessner and Golden, 2005) เชื้อบางสายพันธุ์สร้างเมือกที่สามารถนำไปประยุกต์และผลิตใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้ (Smitinont et al.,1999)

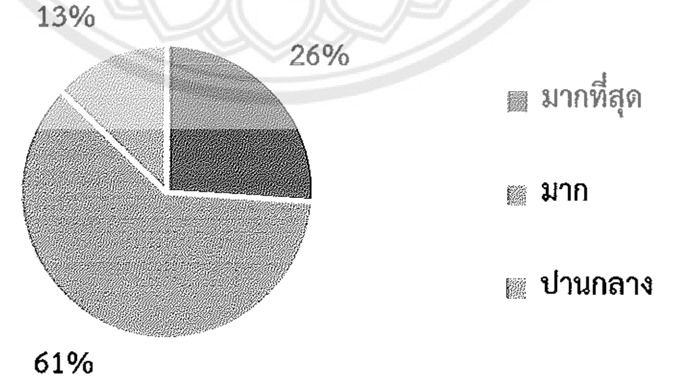
จากการสำรวจกระบวนการผลิตของใบชาเมี่ยงอบแห้งและการหมักเมี่ยงในเขตจังหวัดน่านและพื้นที่ใกล้เคียง จากนั้นวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ-เคมี และจุลชีววิทยา ผลการสำรวจกระบวนการผลิตเมี่ยง ชาหมักในจังหวัดน่าน พบว่า พื้นที่และแหล่งที่มีการผลิตการหมักใบชาเมี่ยงมีอยู่ 2 แหล่ง คือ เกษตรกรบ้านศรีนาป่าน ตำบลเรือง อำเภอเมือง จังหวัดน่าน และเกษตรกรบ้านป่าแดด ตำบลช่อแฮ อำเภอเมือง จังหวัดแพร่ กระบวนการหมักเมี่ยงในจังหวัดน่านและจังหวัดแพร่มีความแตกต่างกันในกระบวกการนึ่งใบชาก่อนการหมักโดยจังหวัดน่านใช้เวลาในการนึ่ง 40 - 50 นาที ส่วนในจังหวัดแพร่ใช้เวลาในการนึ่งนานถึง 3 ชั่วโมง ค่า pH ของกระบวนการผลิตชาใบเมี่ยงที่นึ่ง 40, 60 และ 80 นาที ที่ระยะเวลาการหมัก 6 เดือน เท่ากับ 6.95, 6.46 และ 6.27 ตามลำดับ เมื่อระยะเวลาการหมักนานขึ้นจะทำให้ค่า pH เพิ่มขึ้น และพบว่า % Acidity ของกระบวนการผลิตชาใบเมี่ยงที่นึ่ง 40, 60 และ 80 นาที ที่ระยะเวลาการ

การประเมินระดับความพึงพอใจในด้านการดำเนินงานโครงการอบรมหลักปฏิบัติที่ดีในการผลิต ผลิตภัณฑ์ชาและเมี่ยง ของผู้อบรมพบว่า ผู้เข้าร่วมอบรมได้รับความรู้ความเข้าใจในหลักการปฏิบัติที่ดีในการผลิตอาหาร (จีเอ็มพี.) มากน้อยเพียงใด มีความพึงพอใจมากที่สุดร้อยละ 33 มีความพึงพอใจระดับมากร้อยละ 54 มีความพึงพอใจระดับปานกลางร้อยละ 13



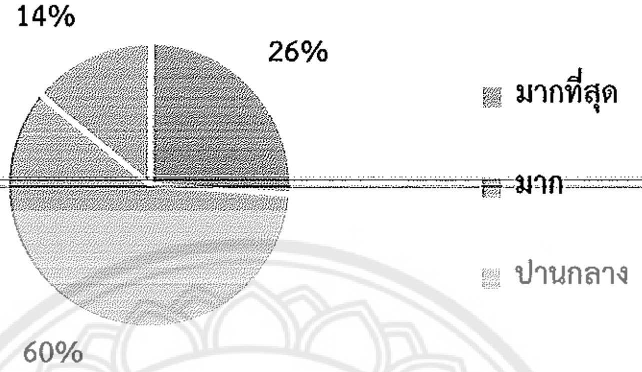
ภาพที่ 32 แผนภาพแสดงร้อยละของการประเมินระดับความพึงพอใจผู้เข้าร่วมอบรมได้รับความรู้ความเข้าใจในหลักการปฏิบัติที่ดีในการผลิตอาหาร (จีเอ็มพี.) มากน้อยเพียงใด โครงการอบรมหลักปฏิบัติที่ดีในการผลิต ผลิตภัณฑ์ชาและเมี่ยง

การประเมินระดับความพึงพอใจในด้านการดำเนินงานโครงการอบรมหลักปฏิบัติที่ดีในการผลิต ผลิตภัณฑ์ชาและเมี่ยง ของผู้อบรมพบว่า ท่านสามารถนำความรู้ที่ได้ไปพัฒนาการผลิตชา – เมี่ยง ของตนเองได้มากน้อยเพียงใด มีความพึงพอใจมากที่สุดร้อยละ 26 มีความพึงพอใจระดับมากร้อยละ 61 มีความพึงพอใจระดับปานกลางร้อยละ 13



ภาพที่ 33 แผนภาพแสดงร้อยละของการประเมินระดับความพึงพอใจ ผู้เข้าอบรมท่านสามารถนำความรู้ที่ได้ไปพัฒนาการผลิตชา – เมี่ยง ของตนเองได้มากน้อยเพียงใด โครงการอบรมหลักปฏิบัติที่ดีในการผลิต ผลิตภัณฑ์ชาและเมี่ยง

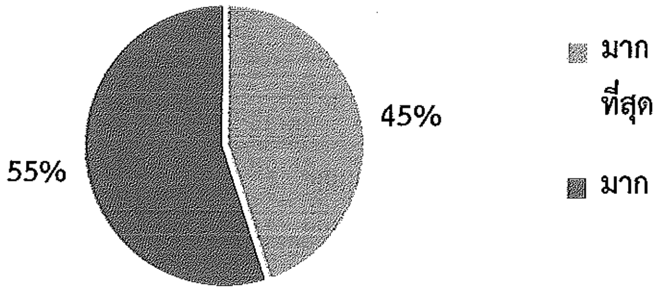
การประเมินระดับความพึงพอใจในด้านการดำเนินงานโครงการอบรมหลักปฏิบัติที่ดีในการผลิต ผลิตภัณฑ์ชาและเมี่ยง ของผู้อบรมพบว่า ท่านสามารถนำความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นได้มากน้อยเพียงใด มีความพึงพอใจมากที่สุดร้อยละ 26 มีความพึงพอใจระดับมากร้อยละ 60 มีความพึงพอใจระดับปานกลางร้อยละ 14



ภาพที่ 34 แผนภาพแสดงร้อยละของการประเมินระดับความพึงพอใจ ท่านสามารถนำความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นได้มากน้อยเพียงใด โครงการอบรมหลักปฏิบัติที่ดีในการผลิต ผลิตภัณฑ์ชาและเมี่ยง

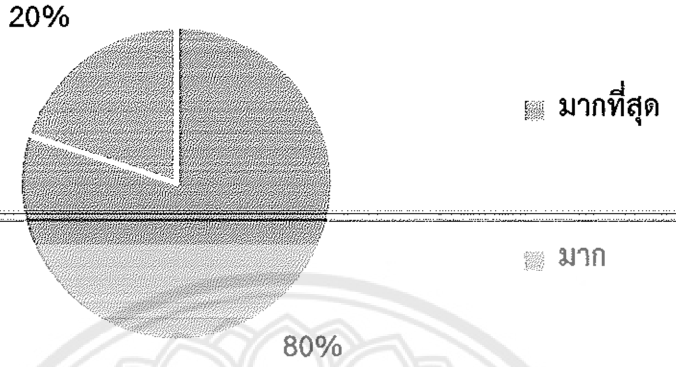
2.3 การประเมินความคิดเห็นของผู้เข้าร่วมการถ่ายทอดความรู้ด้านความพึงพอใจต่อการจัดอบรมโครงการอบรมหลักปฏิบัติที่ดีในการผลิต ผลิตภัณฑ์ชาและเมี่ยง

การประเมินระดับความพึงพอใจในด้านการดำเนินงานโครงการอบรมหลักปฏิบัติที่ดีในการผลิต ผลิตภัณฑ์ชาและเมี่ยง ของผู้อบรมพบว่า มีความพึงพอใจโดยรวมต่อการจัดอบรมโครงการฯ นี้มากน้อยเพียงใด มีความพึงพอใจมากที่สุดร้อยละ 45 มีความพึงพอใจระดับมากร้อยละ 55



ภาพที่ 35 แผนภาพแสดงร้อยละของการประเมินระดับความพึงพอใจ มีความพึงพอใจโดยรวมต่อวิทยากรมากน้อยเพียงใด โครงการอบรมหลักปฏิบัติที่ดีในการผลิต ผลิตภัณฑ์ชาและเมี่ยง

การประเมินระดับความพึงพอใจในด้านการดำเนินงานโครงการอบรมหลักปฏิบัติที่ดีในการผลิตผลิตภัณฑ์ชาและเมี่ยง ของผู้อบรมพบว่า มีความพึงพอใจโดยรวมต่อวิทยากรมากน้อยเพียงใด มีความพึงพอใจมากที่สุดร้อยละ 80 มีความพึงพอใจระดับมากร้อยละ 20



ภาพที่ 36 แผนภาพแสดงร้อยละของการประเมินระดับความพึงพอใจ มีความพึงพอใจโดยรวมต่อวิทยากรมากน้อยเพียงใด โครงการอบรมหลักปฏิบัติที่ดีในการผลิต ผลิตภัณฑ์ชาและเมี่ยง

บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ชาอัสสัม (*Camellia sinensis* var. *assamica*) คือ ชาพื้นเมืองที่ขึ้นตามป่า ลักษณะเป็นลำต้นเดี่ยว สูงประมาณ 6-18 เมตร มีใบใหญ่ เจริญเติบโตได้เร็ว เป็นไม้ยืนต้นขนาดใหญ่ (Van der Vossen and Wessel, 2000) องค์ประกอบที่สำคัญในชาประกอบด้วยสารโพลีฟีนอล (polyphenol) ร้อยละ 20-35 ซึ่งจะมีปริมาณลดลงเมื่อใบมีอายุมากขึ้น (Chu and Juneja, 1999) เป็นผลิตภัณฑ์ท้องถิ่นทางภาคเหนือของประเทศไทยหลายจังหวัด ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ จังหวัดเชียงราย จังหวัดน่าน จังหวัดแพร่ และจังหวัดอุตรดิตถ์ ลักษณะทั่วไปเป็นใบเดี่ยว ปลายแหลม ใบมีความกว้างประมาๆ 17-22 เซนติเมตร มีขั้นตอนโดยการนำใบชาสดมามัดเป็นกำ นึ่งแล้วหมักใส่เกลือและทิ้งไว้จนใบชาเปลี่ยนสภาพเป็นสีเหลือง เมื่อใบยุ่ย จึงจะสามารถนำบริโภคได้ นิยมใช้เป็นของขบเคี้ยวหรืออมเป็นของว่างระหว่างการทำงาน หรือชงดื่มกับน้ำร้อน ช่วยผ่อนคลายความเหน็ดเหนื่อย ปัจจุบันมีอยู่หลายชนิด เช่น เมี่ยงหวาน เมี่ยงเค็ม เมี่ยงหมี่ เมี่ยงขิง เมี่ยงใส่กระเทียมดอง ชาเมี่ยงเป็นแหล่งสำคัญของคาเทชิน (catechin) โดยมีปริมาณสูงถึง 30 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง อยู่ในกลุ่มฟีนอลซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชันที่มีคุณภาพสูง และยังพบ theaflavins, thearubigins ในชาเมี่ยงอีกด้วย (สุรัติวดี ภาคอุทัย, 2551) นอกจากนี้ยังมีรายงานตรวจพบ Lactic acid bacteria เช่น *pediococcus pentosaceus* และ *Lactobacillus plantarum* และ *Lactobacillus* sp. จากเมี่ยง (ใบชาหมัก) และอาหารหมักดองของไทย (Tanasupawat S. and Daengsubha W., 1983 ; Tanasupawat S. at al,1992) ซึ่งเชื้อ Lactic acid bacteria บางชนิดมีคุณสมบัติเป็นเชื้อ probiotic ซึ่งมีผลดีต่อสุขภาพของผู้บริโภคหลายประการ และยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ (Jay, Loessner and Golden, 2005) เชื้อบางสายพันธุ์สร้างเมือกที่สามารถนำไปประยุกต์และผลิตใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้ (Smitinont et al.,1999)

จากการสำรวจกระบวนการผลิตของใบชาเมี่ยงอบแห้งและการหมักเมี่ยงในเขตจังหวัดน่านและพื้นที่ใกล้เคียง จากนั้นวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ-เคมี และจุลชีววิทยา ผลการสำรวจกระบวนการผลิตเมี่ยง ชาหมักในจังหวัดน่าน พบว่า พื้นที่และแหล่งที่มีการผลิตการหมักใบชาเมี่ยงมีอยู่ 2 แหล่ง คือ เกษตรกรบ้านศรีนาป่าน ตำบลเรือง อำเภอเมือง จังหวัดน่าน และเกษตรกรบ้านป่าแดด ตำบลช่อแฮ อำเภอเมือง จังหวัดแพร่ กระบวนการหมักเมี่ยงในจังหวัดน่านและจังหวัดแพร่มีความแตกต่างกันในกระบวกการนึ่งใบชาก่อนการหมักโดยจังหวัดน่านใช้เวลาในการนึ่ง 40 - 50 นาที ส่วนในจังหวัดแพร่ใช้เวลาในการนึ่งนานถึง 3 ชั่วโมง ค่า pH ของกระบวนการผลิตชาใบเมี่ยงที่นึ่ง 40, 60 และ 80 นาที ที่ระยะเวลาการหมัก 6 เดือน เท่ากับ 6.95, 6.46 และ 6.27 ตามลำดับ เมื่อระยะเวลาการหมักนานขึ้นจะทำให้ค่า pH เพิ่มขึ้น และพบว่า % Acidity ของกระบวนการผลิตชาใบเมี่ยงที่นึ่ง 40, 60 และ 80 นาที ที่ระยะเวลาการ

หมัก 6 เดือน เท่ากับ 0.14, 0.14 และ 0.17 ตามลำดับ เมื่อระยะเวลาการหมักนานขึ้นจะทำให้ค่า % Acidity ลดลง ค่า pH และปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ของกระบวนการผลิตชาใบเมี่ยง (เมี่ยงหมัก) การเปลี่ยนแปลงการหมักที่ผ่านการนึ่ง 40 นาที เกิดขึ้นได้ดีกว่าการหมักที่ผ่านการนึ่ง 60 และ 80 นาที ตามลำดับ เมื่อระยะเวลาการหมักนานขึ้นจะทำให้ค่า pH เพิ่มขึ้น มีความสอดคล้องกับปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ โดยคา pH เพิ่มขึ้น แตปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการเจริญของเชื้อที่รวดเร็วทำใหใชกรดในการเจริญตอไป เมื่อระยะเวลาการหมักนานขึ้น ถึง 6 เดือน มีปริมาณกรดที่ลดลง จากรายงานของสิรินดา และคณะ (2548) พบว่าค่า pH ที่เพิ่มขึ้นและปริมาณกรดทั้งหมดที่ลดลงในอาหารหมักขึ้นอยู่กับการเจริญของแบคทีเรียที่สร้างกรดในผลิตภัณฑ์ ผลการศึกษาครั้งนี้จึงเปนขอมูลเบื้องตนสำหรับการใชอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมในการหมักชาเมี่ยงให้แก่เกษตรกรตอไป

การศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิและเวลาต่อคุณภาพใบชาอบแห้งโดยทำการเปรียบเทียบกับวิธีการผลิตแบบดั้งเดิม จากนั้นวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านจุลชีพ ลักษณะทางกายภาพ เช่น สี กลิ่น รส การวิเคราะห์ด้านอนุมูลอิสระจากใบชา การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่า ปริมาณองค์ประกอบทางเคมีในเมี่ยงที่ผ่านการนึ่งเป็นเวลา 7 วัน และทำการหมักเป็นเวลานาน 6 เดือน ปัจจัยที่ศึกษาคือระยะเวลาของการหมักและอุณหภูมิของการนึ่งที่ระกับ 40 60 และ 80 องศาเซลเซียส มีผลต่อค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ปริมาณกรดทั้งหมด และประมาณความชื้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ปริมาณกรด-ด่างของเมี่ยงมีค่าระหว่าง 2.64-6.56 ปริมาณกรดทั้งหมดมีค่าระหว่าง 0.15-0.86% และปริมาณความชื้นมีค่าระหว่าง 20.06-89.02% ระยะเวลาของการหมักเมี่ยงและอุณหภูมิที่ใช้ในการนึ่งเมี่ยงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้แก่ DPPH radical scavenging activity, FRAP, ABTS และปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด (Total polyphenols) แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

การวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วยเทคนิค pour plate ในอาหาร standard plate count วิเคราะห์จำนวน Bile salt resistant LAB ในอาหาร MRS agar ที่เติม oxgall 0.15% ด้วยเทคนิค pour plate วิเคราะห์ราและยีสต์ในอาหาร Rose Bengal agar ด้วยเทคนิค spread plate ตามวิธีของ ISO 7218:2007 ผลการวิเคราะห์ พบว่า จำนวน Total plate count ในช่วง 3 สัปดาห์แรกมีค่าอยู่ระหว่าง Log5 – Log7 ผลิตภัณฑ์เมี่ยงสุดท้ายพร้อมบริโภคมีจำนวนจุลินทรีย์ลดลงเหลือประมาณ Log5 จำนวน Lactic acid bacteria ในช่วง 3 สัปดาห์แรกมีค่าอยู่ระหว่าง Log4 – Log7 ผลิตภัณฑ์เมี่ยงสุดท้ายพร้อมบริโภคมีจำนวนจุลินทรีย์ลดลงเหลือประมาณ Log3 – Log4 จำนวน Bile salt resistant LAB ในช่วง 3 สัปดาห์แรกมีค่าอยู่ระหว่าง Log5 – Log6 ผลิตภัณฑ์เมี่ยงสุดท้ายพร้อมบริโภคมีจำนวนจุลินทรีย์ลดลงเหลือประมาณ Log3 – Log4 จำนวน Yeast and mold ในช่วง 3 สัปดาห์แรกมีค่าอยู่ระหว่าง Log4 – Log7 ผลิตภัณฑ์เมี่ยงสุดท้ายพร้อมบริโภคมีจำนวนจุลินทรีย์ลดลงเหลือประมาณ Log5 – Log

บรรณานุกรม

ธีรพงษ์ เทพกรณ์. 2545. ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับชาในประเทศไทย. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา : www.mfu.ac.th. (7 สิงหาคม 2558).

ธีรพงษ์ เทพกรณ์. 2555. ชา: กระบวนการผลิต และองค์ประกอบทางเคมีจากการหมัก. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา. 17(2): 189-196.

ศรีวัฒนา ทรงจิตสมบูรณ์. 2548. สารต้านอนุมูลอิสระ. สำนักพิมพ์หมอชาวบ้าน. 10-22 หน้า. ศูนย์ศึกษาและพัฒนาวนศาสตร์ชุมชนที่ 2 (เชียงราย). 2553. เมี่ยง ภูมิปัญญาคนห้วยน่าน.

สายลม สัมพันธ์เวชโสภา และคณะ. 2550. การศึกษาสถานภาพปัจจุบันของชาในประเทศไทย. ผลงานวิจัย. มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง. เชียงราย.

สุรัติวดี ภาคอุทัย. 2551. โครงการวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์สารออกฤทธิ์เฉพาะทางจาก พืชตระกูล *Zanthoxylum* ชาเมี่ยง และตะไคร้ต้น. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่.

Ajila, C. M., Leelavathi, K. and Prasada Rao, U.J.S. 2010. Mango peel power: A potential source of antioxidant and dietary fiber in macaroni preparations. Innovat. Food Sci. and Emerging Tech. 11:219-224.

Ananingsih, V.K. Sharma, A. and Zhou, W. 2011. Green tea Catechin during food processing and storage: A review on stability and detection. Food Research International. 50: 469–479

A.O.A.C. 2000. Official Methods of Analysis of the Association of Official Chemist. The Association of Official Analytical Chemists. Washington, D.C.

Benzie, I.F.F. and Strain, J.J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. Analytical Biochemistry, 239: 70-76.

Chu, D. C. and Juneja, L. R. 1997. General chemical composition of green tea and its infusion. In T. Yamamoto, L. R. Juneja, D. C. Chu, & K. Mujo (Eds.), Chemistry and applications of green tea (pp. 13–22). New York: CRC Press.

Haslam, E. 2003. Thoughts on thearubigins. Photochemistry, 64; 61-73.

Huang, Y. Xu, J. and Hu, Q. 2005. Effect of Selenium on Preservation Quality of Green Tea during Autumn Tea Processing Season, Journal of the Science Food and Agriculture. 53: 7444-7447.

International Organization for Standardization. 2007. ISO 7218:2007. Microbiology of food and animal stuffs-General requirements and guidance for microbiological examination. Geneva, ISO.

Jay, J. M., Loessner, M.J. and Golder, D.A. 2005. Modern Food Microbiology 7 th Edt. Springer science and Business Medai, Inc. New york.

Komes, D. Horzic, D. Belscak, A. Ganic, K. and Vulic, I. 2010. Green tea preparation and its influence on the content of bioactive compounds. Food Research International. 43: 167-176.

Kumamoto, M. and Sonda, T. 1998. Evaluation of the Antioxidative Activity of Tea by an Oxygen Electrode Method. Bioscience Biotechnology Biochemistry. 62: 175-177.

Leong, L. P. and Shui, G. 2002. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. Food Chemistry. 76: 69-75.

Lin, J.K. Chen, P.C. Ho, C.T. and Lin-Shiau, S.Y. 2000. The way of tea: the sublime art of oriental tea drinking. Barron's Educational Series, Inc. New York.

Perva-Uzunalic, A. Skerget, M. Kneza, Z. Weinreich, B. Otto F. and Gruner, S. 2006. Extraction of active ingredients from green tea (*Camellia sinensis*): Extraction efficiency of major catechin and caffeine. Journal of Food Chemistry. 96: 597-605.

Roberta, R. Nicoletta, P. and Anna P. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolonization assay. Free radical biology and medicine. 26(-): 1231–1237.

Ronald, LP. Xianli, W. and Karen, S. 2005. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. Journal of agricultural and food chemistry. 53: 4290-4302.

Simic, M. G. and Taylor, K.A. 1988. Intiduction to peroxidation and antioxidation mechanisms. Basic Life Science. 49:1-10.

Smitinont, T., Tansakul, C., Tanasupawat, S., Keeratipibul, T., Navarini, L., Bosco, M., Cescutti, P., 1999 Exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria strains from traditional Thai fermented foods: isolation, identification and

exopolysaccharide characterization. International Journal of Foods Microbiology. 51, 105-111.

Tanasupawat, S., Daengsubha, W., 1983 *Pediococcus* species and related bacteria found in fermented foods and related materials in Thailand. J. Gen. Appl. Microbiol. 29, 487-506.

Tanasupawat, S., Ezaki, T., Suzuki, K., Okada, S., Komakata, K., Kozaki, M., 1992 Characterization and identification of *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus plantarum* strains from fermented foods in Thailand. J. Gen. Appl. Microbial. 38, 121-134.

Tang, FY. And Meydani, M. 2001. Green tea catechin and vitamin E inhibit angiogenesis of human microvascular endothelial cells through suppression of IL-8 production. Nutr Cancer. 41: 119–125.

Van der Vossen, H.A.M. and M. Wessel. 2000. Plant Resources of South-East Asia No. 16: Stimulants. PROSEA Foundation Indonesia. 201 p.

Yamazaki T. 2007. The cerebellum as a liquid state machine. Neural Newt. 20: 290–297.

Yang, C. Yang, G.Y. Landau, J.M. Kim, S. and Liao, J. 1998. Tea and Tea Polyphenols Inhibit Cell Hyper proliferation, Lung Tumorigenesis and Tumor Progression. Experimental Lung Research. 24: 629-639.

Yen, G.C. and Chen, H.Y. 1995. Antioxidant Activity of Various Tea Extracts in Relation to Their Ant mutagenicity. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 43: 27-32.

Vinson, J. and Dabbagh, Y.A. 1998. Tea phenols: Antioxidant effectiveness of teas, tea components, tea fractions and their binding with lipoproteins. Nutr. Res. 18: 1067-75

Zhen, Y. Chen, Z. Chen, S. and Chen, M. 2002. Tea: Bioactivity and Therapeutic Potential. London: Tayler & Francis.

ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยนเรศวร

เอกสารประกอบการฝึกอบรม

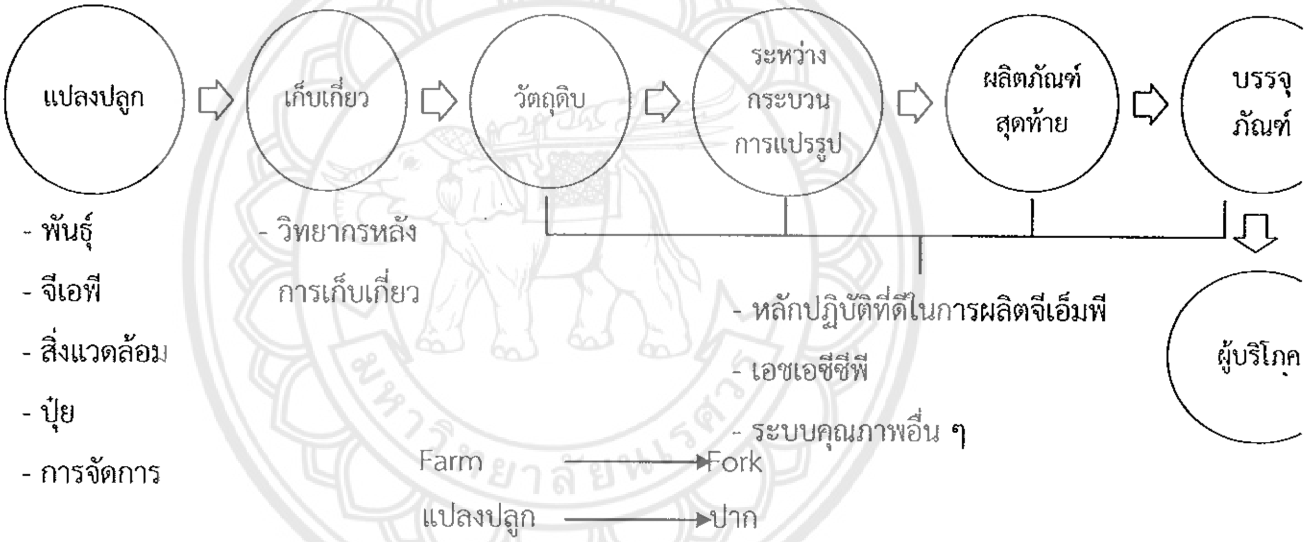
เรื่อง "หลักปฏิบัติที่ดีในการผลิต ผลิตภัณฑ์ชาและเมี่ยง"

วันที่ 16 กรกฎาคม 2560 ณ วิสาหกิจชุมชนกลุ่มผลิตภัณฑ์ชา และส่งเสริมการท่องเที่ยวเชิงนิเวศน์ศรีนาป่าน-ตาแวน จังหวัดน่าน

โดย ผศ.ดร.บุญส่ง แสงอ่อน
สาขาวิชาอุตสาหกรรมเกษตร
คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม
มหาวิทยาลัยนเรศวร อ.เมือง จ.พิษณุโลก

การผลิต ชา – เมี่ยง คุณภาพดีและปลอดภัยต่อผู้บริโภค

หลักการ



หลักปฏิบัติที่ดีในการผลิต (จีเอ็มพี)

- สุขาภิบาล
- สุขลักษณะ
- สุขอนามัย
- สะอาด

เกี่ยวข้องกับ

1. สถานที่ตั้งและสิ่งแวดล้อม
2. ตัวอาคารและสิ่งอำนวยความสะดวก
3. เครื่องจักรและอุปกรณ์
4. กระบวนการผลิต

5. การบำบัดของเสีย
6. การกำจัดแมลงและสัตว์พาหะนำโรค
7. น้ำใช้
8. สุขอนามัยส่วนบุคคล
9. การฝึกอบรม

เอกสารประกอบการฝึกอบรม
เรื่อง อนามัยส่วนบุคคลของผู้ปฏิบัติงานในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร

โดย ผศ.ดร.บุญส่ง แสงอ่อน
สาขาวิชาอุตสาหกรรมเกษตร
คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม
มหาวิทยาลัยนเรศวร อ.เมือง จ.พิษณุโลก

ผู้จัดการโรงงานจะต้องรับผิดชอบอนามัยส่วนบุคคลดังนี้

- ตรวจ – วัด
- ระมัดระวัง

สิ่งที่ต้องดำเนินการ คือ

(1) การควบคุมโรค

ตรวจทางการแพทย์/สังเกตพบความผิดปกติต่าง ๆ ส่วนบุคคลดังนี้

1.1. ป่วย
1.2. มีบาดแผล
1.3. ลอยถลอก
1.4. เจ็บ
1.5. แผลติดเชื้อ
1.6. แหล่งผิดปกติอื่น ๆ ของการปนเปื้อนด้วยเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่จะปนเปื้อนลงในอาหาร สัมผัสกับอาหาร หรือบรรจุภัณฑ์

บุคคลต่าง ๆ เหล่านี้ควรแยกออก (กันออก) จากบริเวณ ที่เกี่ยวข้องกับหน่วยควบคุมกระบวนการผลิตอาหาร จนกว่าจะแน่ใจว่า สถานการณ์เหล่านั้นได้รับการแก้ไขแล้ว แต่ละบุคคลจะต้องได้รับการสอนให้รายงานสถานการณ์สุขภาพต่อหัวหน้างาน

(2) ความสะอาด

ทุกคนที่ทำงานและมีโอกาสสัมผัสโดยตรงกับอาหาร หรือสัมผัสกับผิวอาหารและวัสดุที่เกี่ยวข้องกับบรรจุภัณฑ์ ควรรู้จักหลักปฏิบัติทางด้านอนามัยระหว่างการปฏิบัติหน้าที่ เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของสิ่งต่าง ๆ ลงในอาหาร

วิธีการที่จะรักษาความสะอาดมีดังนี้ (แต่ไม่ได้จำกัดเฉพาะที่กล่าวนี้)

2.1 สวมชุดคลุมชั้นนอกที่เหมาะสมต่อการปฏิบัติงานในส่วนที่จะป้องกันการปนเปื้อนของอาหารและบรรจุภัณฑ์ (ครอบคลุมไปถึงสวมรองเท้าบูทป้องกันสิ่งสกปรก)
2.2 รักษาความสะอาดส่วนบุคคลอย่างเพียงพอ

2.3 ล้างมือให้สะอาดอย่างทั่วถึง (และใช้สารกำจัดเชื้อ ถ้าจำเป็นต้องป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่ไม่พึงประสงค์) ในอ่างล้างมือที่เหมาะสม ก่อนและหลังเลิกปฏิบัติงานทุกครั้ง และทุกครั้งที่เห็นว่ามือเริ่มมีความสกปรกหรือมีการปนเปื้อน สุ่มเช็คเชื้อจากมือ ถ้ามีเชื้อมากไม่ทำ O.T.

2.4 ถอดเครื่องประดับอัญมณี หรือวัตถุอื่น ๆ ที่ไม่ปลอดภัยทั้งหมด ซึ่งอาจตกลงในอาหาร อุปกรณ์ หรือภาชนะบรรจุ และถอดเครื่องประดับอัญมณีที่มือ ซึ่งไม่สามารถจะกำจัดเชื้อได้อย่างเพียงพอในช่วงเวลาที่ใช้มือประกอบอาหาร ถ้าอัญมณีที่มือไม่สามารถถอดออกได้ อาจสามารถใช้วัสดุบางอย่างคลุมซึ่งสามารถรักษาความสะอาด และมีการสุขาภิบาลที่สมบูรณ์ และมีประสิทธิภาพในวัสดุบางอย่างคลุมซึ่งสามารถรักษาความสะอาด และมีการสุขาภิบาลที่สมบูรณ์ และมีประสิทธิภาพในการป้องกันการปนเปื้อนของวัตถุเหล่านี้ลงในอาหาร สัมผัสกับอาหารหรือบรรจุภัณฑ์

2.5 ดูแลรักษาถุงมือ (ถ้ามีการใช้ถุงมือในการ หยิบ – จับ อาหาร) ให้ สะอาดอย่างสมบูรณ์และอยู่ในสภาพที่มีสุขาภิบาล ถุงมือควรทำจากวัสดุกันซึม

2.6 สวมใส่ (ที่เหมาะสมและรัดกุม) ตาข่ายคลุมผมที่คาดผม หมวก ที่คลุมเคลา หรืออุปกรณ์อื่น ๆ ที่ป้องกันความสกปรกจากผม

2.7 ห้องเก็บเสื้อผ้าหรือของใช้ส่วนบุคคลต้องแยกบริเวณออกไป เพื่อไม่ให้สัมผัสกับอาหารหรือแยกออกจากบริเวณที่ล้างมือหรือภาชนะ

2.8 จำกัดขอบเขตของการกระทำต่อไปนี้ให้อยู่ในบริเวณที่จะไม่สัมผัสกับอาหาร หรือเครื่องมือหรือภาชนะที่จะถูกล้าง

2.9 การกินอาหาร การเคี้ยวหมากฝรั่ง การดื่มเครื่องดื่ม หรือการสูบบุหรี่ การกระทำอื่น ๆ ต่อไปนี้ (แต่ไม่จำกัดเฉพาะที่กล่าวถึง) จำเป็นต้องระมัดระวัง เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของอาหาร การสัมผัสกับอาหารหรือบรรจุภัณฑ์ด้วยเชื้อจุลินทรีย์หรือสิ่งแปลกปลอมต่าง ๆ เช่น การมีเหงื่อไหล ผม เครื่องสำอาง บุหรี่ สารเคมีต่าง ๆ และยาที่ใช้ทาผิวหนัง

2.10 หลีกเลี่ยงการพูดจาระหว่างปฏิบัติงาน สวมหน้ากากอนามัย

(3) การให้การศึกษาและการฝึกอบรม

ความรับผิดชอบของแต่ละบุคคลในการระบุความล้มเหลวของการสุขาภิบาลหรือการปนเปื้อนของอาหาร ควรจะมีพื้นฐานด้านการศึกษาหรือประสบการณ์หรือทั้งสองอย่าง เพื่อให้ถึงระดับที่เพียงพอต่อการผลิตอาหารที่สะอาดและปลอดภัย ผู้ประกอบอาหารและหัวหน้างานควรได้รับการอบรมที่เหมาะสม ใน

เทคนิคการประกอบอาหารที่เหมาะสมและหลักการป้องกันด้านอาหาร และควรได้รับการแจ้งเกี่ยวกับอันตรายของอนามัยส่วนบุคคลที่ไม่ดีและการปฏิบัติที่ไม่เป็นไปตามหลักการสุขาภิบาล

(4) ตัวอย่างแบบฟอร์มการตรวจประเมินการสุขาภิบาลรายวัน/หรือรายเดือน ในส่วนที่เกี่ยวข้องกับอนามัยส่วนบุคคล

วัน/เดือน/ปี____________เวลา____________

ผู้ตรวจ________________

รายการที่ตรวจประเมิน	พอใจ	ต้องปรับปรุง	ไม่พอใจ	คำอธิบายเพิ่มเติม
1. ความสะอาด				
2. การคลุมศีรษะ				
3. การสูบบุหรี่				
4. อาหาร				
5. อื่น ๆ				

(5) แผนการจัดการสุขาภิบาลในโรงอาหาร ในส่วนที่เกี่ยวข้องกับอนามัยส่วนบุคคลของของคนงานและการปฏิบัติงานของคนงาน ควรพิจารณาจากคำถามต่อไปนี้

5.1 คนงานทุกคน ได้รับการฝึกอบรมดีเพียงพอหรือยังว่าสิ่งที่เขาควรทำคืออะไร ?

5.2 มาตรฐานอนามัยส่วนบุคคล ถูกบังคับอย่างมีประสิทธิภาพหรือไม่ ?

5.3 คนงานทุกคนของท่านกำลังสวมใส่เครื่องอัญมณี ผ้าพันแผล หรือมีความเจ็บป่วย ติดเชื้อหรือบาดเจ็บ ซึ่งสามารถปนเปื้อนลงในอาหารหรือไม่ ?

5.4 คนงานทั้งหลาย สวมอุปกรณ์คลุมผมและสิ่งสกปรกที่เหมาะสมหรือไม่ ?

5.5 คนงานของท่านล้างมือหลังเข้าห้องน้ำแต่ละครั้ง หรือหลังจากเสร็จการปฏิบัติงานในหน่วยต่าง ๆ หรือไม่ ?

5.6 สถานที่ล้างมือและบริเวณกำจัดเชื้อ อยู่ใกล้บริเวณหน่วยปฏิบัติงานของคนหรือไม่ ?

5.7 การสูบบุหรี่หรือการรับประทานอาหารถูกห้ามในบริเวณที่ใช้เตรียมอาหาร และบริเวณที่ใช้แปรรูปอาหารหรือไม่ ?

5.8 การจราจรในโรงงานอาหาร ถูกควบคุมเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของอาหารระหว่างกระบวนการแปรรูปหรือไม่ ?

5.9 คำถามอื่น ๆ ที่สัมผัสกับอนามัยส่วนบุคคล เช่น ห้องน้ำห้องส้วม น้ำยา สบู่ล้างมือ น้ำร้อน น้ำเย็น ความสว่าง ฯลฯ

(6) การให้คำแนะนำ/การให้คำปรึกษา

เพื่อให้เกิดความมั่นว่าบุคลากรทั้งหลายปฏิบัติตามข้อบังคับทั้งหมดที่กล่าวมา ควรจะมีการกำหนดอย่างชัดเจนในการให้คำปรึกษารายบุคคล (สามารถกระทำได้) อย่างเพียงพอ

ผู้ให้คำปรึกษาต้องมีคุณสมบัติที่จะตีความหมาย (ประเมิน) สิ่งที่กล่าวมาแล้วก่อนหน้านี้ทั้งหมดเพื่อการบริหารจัดการ อย่างไรก็ตามในการบริหารจัดการต้องเข้าใจว่า แต่ละบุคคลได้รับการฝึกอบรมที่จำเป็นต่าง ๆ ได้รับเทคนิคการประกอบอาหารที่เหมาะสม และรู้หลักการปกป้องอาหาร และอันตรายจากการสุขาภิบาลที่ไม่ดี และการปฏิบัติที่ไม่ถูกหลักสุขาภิบาล

การบริหารจัดการต้องจัดสิ่งต่อไปนี้ให้ : ห้องน้ำที่สะอาด ห้องแต่งตัวที่สะอาด และห้องเปลี่ยนแต่งกายและ/หรือห้องเก็บของใช้ส่วนตัว และสิ่งอำนวยความสะดวกสำหรับการล้างมือในห้องน้ำและอยู่ใกล้บริเวณปฏิบัติงาน เช่น สบู่เหลว (ระยะเวลา 15 – 20 วินาที) สารกำจัดเชื้ออื่น ๆ และผ้าเช็ดมือ หรือเครื่องเป่าลมร้อน (เพื่อทำให้แห้ง) ยิ่งกว่านั้น ควรจัดชุดเครื่องแบบให้เพียงพอด้วยบริการซัก – รีด ที่เหมาะสม

การบริหารจัดการต้องจัดให้มีการฝึกอบรมที่เหมาะสมสำหรับผู้ประกอบอาหารทุกคน ในหลักสุขาภิบาลอาหารและหลักปฏิบัติต่าง ๆ โปรแกรมฝึกอบรมต้องดำเนินไปและคนงานแต่ละคนควรจะถูกบังคับให้เข้ารับการฝึกอบรมปีละครั้ง สิ่งเหล่านี้มีประสิทธิภาพสูงสุดเมื่อมีความพอเหมาะระหว่างการบริหารการจัดการกับแต่ละบุคคล บางครั้งมีการใช้แผ่นปลิวและโปสเตอร์ช่วยในการฝึกอบรม ต้องเขียนติดไว้ด้วย

คนงานทุกคนต้องเข้าใจกฎและข้อบังคับพื้นฐานทางอนามัยส่วนบุคคล สิ่งต่อไปนี้คือจุดเพิ่มเติมต่าง ๆ ทางอนามัยส่วนบุคคล การบริหารจัดการที่เหมาะสม คือ

1. ทุกคนต้องอาบน้ำทุกวัน
2. การสระผม อย่างน้อยอาทิตย์ละครั้ง
3. รักษาเล็บให้สะอาดและตัดให้เหมาะสม
4. รักษาความสะอาดชุดชั้นในและชุดเครื่องแบบให้สะอาด (มักใช้สีขาวเพราะสังเกตเห็นความสะอาด แต่ระยะหลังสีอื่น ๆ ก็ใช้มาก)
5. สวมตาข่ายคลุมผม เพื่อป้องกันผม (ทั้งหมด)
6. ผู้ชายต้องโกนหนวด หรือต้องสวมที่คลุมเคลา ยิ่งกว่านั้นต้องตัดเล็มหนวดให้เรียบร้อยและห้ามต่ำกว่ามุมปาก
7. ผู้ชายไม่ควรปล่อยผมไว้ยาวต่ำกว่าใบหู
8. แต่ละบุคคลทั้งหมดควรเรียนรู้ที่จะล้างมือหลังจาก :

- การไอและการจาม
- การเข้าห้องส้วม
- หลังจากสูบบุหรี่
- หลังจากหยุดพัก
- ก่อนกลับเข้าไปปฏิบัติงาน
- การหยิบจับภาชนะสกปรก หรือของเสีย
- การจับผลิตภัณฑ์ สัตว์ และหลังจากการใช้โทรศัพท์

การล้างมือที่ถูกต้อง : <u>ต้องให้ระดับมือที่ล้าง</u>อยู่ต่ำกว่าข้อศอกเล็กน้อย

9. ปากกา ดินสอ และอื่น ๆ ไม่ควรพกติดกระเป๋าที่เหนือเอวขึ้นมา จะเป็นการดีกว่าถ้าชุดเสื้อผ้าไม่มีกระเป๋าเหนือเอว
10. ขวดแก้ว แก้วน้ำ เครื่องแก้วต่าง ๆ และภาชนะบรรจุที่เป็นแก้วอื่น ๆ ไม่ควรได้รับอนุญาตให้นำเข้ามาบริเวณเตรียมอาหาร การแปรรูป หรือบริเวณบรรจุหีบห่อ ยกเว้นถ้าใช้สำหรับการบรรจุอาหาร
11. ความปลอดภัยส่วนบุคคลที่ทำในโรงงานอาหารควรจะถูกสังเกตอย่างเข้มงวด ห้ามสิ่งต่อไปนี้ : ห้ามวิ่งเล่นหยอกล้อ ขับรถบรรทุก การใช้ทางลัด (มุดใต้สายพานหรืออื่น ๆ ไม่ว่าจะอยู่ระหว่างเดินเครื่องหรือไม่ก็ตาม)
12. รองเท้าและเสื้อผ้าที่ใช้ป้องกันรวมทั้งแว่นตากันสารเคมี กรดด่างเข้าตา (ตาบอดได้) ควรสวมใส่ตลอดเวลา
13. คนงานที่เกี่ยวข้องกับการผลิตแต่ละคนต้องรับผิดชอบดูแลพื้นที่ปฏิบัติงานของตนจากการหมักหมมของอาหาร ฝุ่นละออง ความสกปรก หรือของเสีย ซึ่งแมลงหรือแบคทีเรียอาจอาศัยหรือเพาะพันธุ์
14. พนักงานทุกคนต้องกดน้ำล้างโถปัสสาวะและส้วมหลังจากใช้ทุกครั้ง ปัญหา : มือสกปรกติดอยู่ปุ่มกด ถ้าอัตโนมัติจะดีกว่า
15. ประตูหน้าต่างทั้งหมดต้องมีฉากพิเศษที่ป้องกันแมลง หรือหนูเข้าไปข้างในและห้ามเปิดแง้มทิ้งไว้
16. ภาชนะที่ใช้บรรจุระหว่างกระบวนการผลิต ควรถูกปิดฝาเมื่อบรรจุอาหารไว้
17. เหงื่อ หรือวัสดุคล้ายเส้นผมบนร่างกายของพนักงาน ควรหลีกเลี่ยงในกระบวนการผลิต
18. ไม่ควรใช้น้ำยาเคลือบเล็บตกแต่งเล็บ ในบริเวณเตรียมการแปรรูป หรือบริเวณบรรจุ – หีบห่อ
19. ผู้ที่ทำการดูแล ไม่ควรว่างเครื่องมือส่วนประกอบต่าง ๆ ที่จะถูกซ้อมแซมและอื่น ๆ บนบริเวณที่จะสัมผัสกับอาหาร

20. อาหารต่าง ๆ ที่ตกหล่นอยู่บนพื้นต้องถูกกำจัดโดยทันที ดีกว่าจะปล่อยให้ปนอยู่ในกระบวนการผลิต (ห้ามหยิบขึ้นมาใส่โดยตั้งใจ หรือ.....)

ต้องตรวจสอบตู้เก็บของใช้ทุกวัน เพื่อให้แน่ใจว่าตู้เก็บอุปกรณ์สะอาดและอยู่ภายใต้การควบคุมดูแล ตู้เก็บของใช้เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติที่ดีของอาหาร จึงต้องมีการดูแลเพราะอาจมีการปนเปื้อนจากสิ่งดังกล่าว ดังนั้น พื้นฐานแห่งการตรวจสอบเป็นประจำสม่ำเสมอจึงเป็นคำตอบเดียวของเรื่องดังกล่าวนี้

ข้อแนะนำเหล่านี้รวมทั้งหลักปฏิบัติที่ดีในการผลิตส่วนอื่น ๆ ควรจะใช้กับพนักงานทุกคน และพนักงานทุกคนควรถูกขอร้องให้อ่านและเซ็นต์ชื่อในเอกสารว่าผ่านการอ่านแล้ว ปัญหาทางสุขาภิบาลส่วนมาก สามารถแก้ไขได้ถ้าทุกคนปฏิบัติตามหลักการนี้

ข้อเสนอแนะอีกอย่างหนึ่งที่จะใช้เผชิญกับอันตรายต่าง ๆ ในโรงงานอาหาร คือ คนงานทุกคนอยู่ภายใต้กฎหมาย ต้องรู้กฎหมายและข้อบังคับที่เกี่ยวข้องกับการบริหารจัดการด้านความปลอดภัยและสุขภาพในการประกอบอาชีพ ยิ่งไปกว่านั้นแล้วคนงานควรรู้ตำแหน่งของเอกสารข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับความปลอดภัยด้วย

<u>เอกสารอ้างอิง</u>

Gould, W.A. 1994. CGMP's/Food Plant Sanitation. 2nd ed. (TI Publications Inc., Baltimore, MD.)

<u>กิจกรรม</u> อนามัยส่วนบุคคล

กลุ่มที่.. วัน/เดือน/ปี...

1. จงสรุปกิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับอนามัยส่วนบุคคลที่ท่านเคยดำเนินการจริงมาแล้วในกระบวนการแปรรูปอาหาร

สิ่งที่ทำถูกต้องแล้ว	สิ่งที่ทำผิดพลาดมาแล้ว

2. จงเสนอแนวทางปรับปรุงอนามัยส่วนบุคคลในกระบวนการแปรรูปอาหารสำหรับกลุ่มของท่าน หลังจากกลับจากการฝึกอบรมครั้งนี้แล้ว

....

....

....

....

....

....

....

....

....

แบบประเมินการโครงการฝึกอบรม

เรื่อง "หลักปฏิบัติที่ดีในการผลิต ผลิตภัณฑ์ชาและเมี่ยง"

วันที่ 16 กรกฎาคม 2560 เวลา 08.00 – 16.30 น.

ณ วิสาหกิจชุมชนกลุ่มผลิตภัณฑ์ชา และส่งเสริมการท่องเที่ยวเชิงนิเวศน์ ศรีนาป่าน – ตาแวน อำเภอเมือง จังหวัดน่าน

คำชี้แจง คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร ใคร่ขอความร่วมมือจากท่านโปรดแสดงความคิดเห็นลงในแบบประเมินผลการจัดงานเพื่อจักนำข้อมูลดังกล่าวมาปรับปรุงการดำเนินงานในครั้งต่อไป

โปรดทำเครื่องหมาย √ ลงในช่อง ( ) หรือเติมข้อความลงในช่องว่างให้ตรงกับความคิดเห็นของท่านมากที่สุด

ตอนที่ 1 ข้อมูลทั่วไป

1.1 เพศ ( ) ชาย ( ) หญิง อายุ......................ปี

1.2 สถานภาพ ( ) ผู้ประกอบการ
( ) เกษตรกร
( ) ผู้สนใจทั่วไป

1.3 ระดับการศึกษา ( ) ต่ำกว่าปริญญาตรี โปรดระบุ................
( ) ปริญญาตรี
( ) สูงกว่าปริญญาตรี โปรดระบุ................

ตอนที่ 2 ความคิดเห็นของท่านต่อการจัดอบรมครั้งนี้

ประเด็น	ระดับความพึงพอใจ				
	มากที่สุด	มาก	ปานกลาง	น้อย	น้อยที่สุด
1. ภาคการดำเนินงาน					
1.1 การประชาสัมพันธ์โครงการฯ					
1.2 ความเหมาะสมของสถานที่การจัดอบรม					
1.3 ความเหมาะสมของรูปแบบการจัดการในการลงทะเบียน					
1.4 เอกสารประกอบโครงการฯ					

(โปรดพลิกด้านหลัง)

ประเด็น	ระดับความพึงพอใจ				
	มากที่สุด	มาก	ปานกลาง	น้อย	น้อยที่สุด
1.5 การอำนวยความสะดวกของเจ้าหน้าที่					
1.6 ความเหมาะสมของระยะเวลาของการจัดอบรม					
1.7 อาหารและเครื่องดื่ม					
2. ภาคการบรรยาย					
2.1 ท่านเข้าใจเกี่ยวกับการผลิตชา – เมี่ยง ให้มีคุณภาพดีและปลอดภัยต่อผู้บริโภค					
2.2 ท่านได้รับความรู้ความเข้าใจในหลักการปฏิบัติที่ดีในการผลิตอาหาร (จีเอ็มพี.)					
2.3 ท่านสามารถนำความรู้ที่ได้ไปพัฒนาการผลิตชา – เมี่ยง ของตนเองได้					
2.4 ท่านสามารถนำความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นได้					
3. ความพึงพอใจต่อการจัดอบรม					
3.1 ท่านมีความพึงพอใจโดยรวมต่อการจัดอบรมโครงการฯ					
3.2 ท่านมีความพึงพอใจโดยรวมต่อวิทยากร					

<u>ตอนที่ 3 ความคิดเห็นและข้อเสนอแนะเพิ่มเติม</u>

....

....

....

....

....

....

กรุณาส่งคืนที่เจ้าหน้าที่ ณ โต๊ะลงทะเบียน