สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานการวิจัย

ศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำหมักคอมบูชา

Studied on Antimicrobial Activity and Antioxidant of Kombucha Tea

รองศาสตราจารย์ดวงใจ โอชัยกุล

RCH
ด1ь4ศ
2559

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 146125
วัน.เดือน.ปี 24 เม.ย. 2560

.b. 12841420
.i.....

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบรายได้คณะวิทยาศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2559
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการวิจัย ศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำหมักคอมบูชา
แหล่งเงิน (ระบุแหล่งทุน) เงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์
ประจำปีงบประมาณ 2559
จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 50,000 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ ตุลาคม 2558 ถึง กันยายน 2559
ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการวิจัย พร้อมระบุ หน่วยงานต้นสังกัด
รศ.ดวงใจ โอชัยกุล คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทคัดย่อ

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการหมักคอมบูชาจากชาสามชนิด คือ ชาอู่หลง ชาดำ และชาเขียว ที่มีความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นร้อยละ 10 15 และ 20หมักเป็นเวลา 10 วัน พบว่า ชาดำและชาเขียวที่มีความเข้มข้นซูโครสร้อยละ 15 และ 20 มีค่าพีเอชและปริมาณน้ำตาลซูโครสต่ำสุดเช่นเดียวกับปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติก และผลผลิตเซลลูโลสมีค่าสูงสุด จากนั้นทำการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ของคอมบูชาที่ผลิตจากชาดำ และชาเขียวที่มีความเข้มข้นซูโครสร้อยละ 15 และ 20 หมักเป็นเวลา 10 วันโดยใช้วิธี agar diffusion พบว่าชาดำ และชาเขียวมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยเฉพาะ *Vibrio parahaemolyticus* TISTR 1596 การหมักด้วยชาเขียวมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดี โดยมีบริเวณที่มีการยับยั้งการเจริญของ *Bacillus cereus* TISTR 5040 มีเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส 13.36 ± 1.21 มิลลิเมตร, *Staphylococcus aureus* TISTR 118 มีเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส12.94 ± 0.38 มิลลิเมตร, *Listeria monocytogenes* มีเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส 14.60 ± 0.59 มิลลิเมตร, *E. coli* TISTR 887 มีเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส 13.98 ± 1.01 มิลลิเมตร, *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 781 มีเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส 13.20 ± 0.54 มิลลิเมตร, *Salmonella typhimurium* TISTR 5562 มีเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส 12.27 ± 0.67 มิลลิเมตรและ *Vibrio parahaemolyticus* TISTR 1596 มีเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส 25.78 ± 0.78 มิลลิเมตร

ศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ของเครื่องดื่มคอมบูชาที่เตรียมจากใบชาชนิดต่างๆ คือ ชาดำ ชาเขียว และชาอู่หลง และศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการหมักคอมบูชาที่มีผลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ทำการหมักคอมบูชาเป็นระยะเวลา 10 วัน พบว่าชาดำ ชาเขียว และชาอู่หลง มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงในช่วงวันที่ 7 – 10 ของการหมัก ซึ่งชาดำมีปริมาณฟีนอลิกสูงสุด รองลงมาเป็น ชาเขียว และชาอู่หลง ตามลำดับ และทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอช พบว่าจากการหมัก 10 วัน ชาดำมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงสุด รองลงมาคือ ชาเขียว และชาอู่หลง ตามลำดับ คอมบูชาจากชาดำและ ชาเขียว หมักเป็นเวลา 10 วัน ที่ความเจือจาง 200 เท่า มีร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอช เท่ากับ 58.31 ± 0.62 และ 48.33 ± 1.24 ตามลำดับ ชาอู่หลงที่ความเจือจาง 100 เท่า มีร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอช เท่ากับ 44.72 ± 2.62

คำสำคัญ : คอมบูชา ชา ฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Title Studied on Antimicrobial Activity and Antioxidant of Kombucha Tea
Researcher Assoc. Prof. Duangjai Ochaikul
Department of Biology, Faculty of Science,
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

ABSTRACT

This study focused on the optimal conditions of kombucha fermentation from three kinds of tea; oolong, black and green teas which were fermented with sucrose concentration of 10 % (w/v), 15% (w/v) and 20% (w/v) for 10 days. The optimum conditions for kombucha fermentation were obtained from black and green teas with sucrose concentration of 15% (w/v) and 20% (w/v).They produced the lowest pH, sucrose concentration and the highest total acidity (acetic acid) and yield of cellulose. Then, studied on antibacterial activity of kombucha from black and green teas which were fermented for 10 days. It was tested by agar diffusion method. Black and green teas had effective antibacterial activities especially *Vibrio parahaemolyticus* TISTR 1596. The green fermented tea exhibited higher antimicrobial than black tea. It show inhibition zones such as *Bacillus cereus* TISTR 5040 (13.36 ± 1.21 mm), *Staphylococcus aureus* TISTR 118 (12.94 ± 0.38 mm), *Listeria monocytogenes* (14.60 ± 0.59mm), *E. coli* TISTR 887 (13.98 ± 1.01 mm), *Pseudomonas aeruginosa* TISTR 781(13.20± 0.54 mm), *Salmonella typhimurium* TISTR 5562 (12.27 ± 0.67 mm) and *Vibrio parahaemolyticus* TISTR 1596 (25.78 ± 0.78 mm).

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

Keywords : kombucha, tea, antimicrobial activities, antioxidant activity

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยความร่วมมือของนักศึกษาระดับปริญญาตรี ชั้นปีที่ 4 สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง รวมทั้งเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยาทุกท่านที่ได้เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสารเคมีบางส่วนในการทำวิจัย งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากเงินงบรายได้คณะฯ ประจำปีงบประมาณ 2559

รองศาสตราจารย์ดวงใจ โอชัยกุล
หัวหน้าโครงการวิจัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ฌ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	1
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 วิธีดำเนินการวิจัย	2
1.5 สมมุติฐานงานวิจัยและกรอบแนวคิดของโครงงานวิจัย	3
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	5
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
2.1 คอมบูชา (Kombucha)	6
2.1.1 ความเป็นมาของคอมบูชา	6
2.1.2 เครื่องดื่มชาหมักคอมบูชา (Kombucha)	6
2.2 จุลินทรีย์ที่พบในชาหมักคอมบูชา	7
2.2.1 แบคทีเรียเซลลูโลส (Bacterial cellulose)	7
2.2.2 ยีสต์ (Yeast)	9
2.3 ปฏิกิริยาการเกิดชาหมัก	10
2.4 การสังเคราะห์และสะสมเซลลูโลสจากแบคทีเรียโดยเชื้อ *A. xylinum*	10
2.5 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของเชื้อแบคทีเรียเซลลูโลส	11
2.5.1 วัตถุดิบที่ใช้ในการหมัก	11
2.5.2 ออกซิเจน	11
2.5.3 ความเป็นกรดด่าง	11
2.5.4 อุณหภูมิ	11
2.5.5 แหล่งคาร์บอน	11
2.6 กระบวนการผลิตชา	12
2.6.1 ชาเขียว	12
2.6.2 ชาอู่หลง	13
2.6.3 ชาดำ	13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.7 การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์	14
2.7.1 การใช้สารปฏิชีวนะ	15
2.7.2 กลไกการออกฤทธิ์ของสารต้านจุลินทรีย์และการทำลายจุลินทรีย์	15
2.8 การศึกษาผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อโดยวิธี Agar diffusion	16
2.9 ประโยชน์ของคอมบูชา	17
2.9.1 ประโยชน์ของกรดอินทรีย์ที่พบในคอมบูชา	17
2.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	18
2.10.1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของคอมบูชา	18
2.10.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องของการหมักคอมบูชา	18
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	**20**
3.1 อุปกรณ์และสารเคมี	20
3.1.1 เชื้อจุลินทรีย์	20
3.1.2 วัตถุดิบ	20
3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์	20
3.1.4 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	20
3.1.5 เครื่องมือและอุปกรณ์	20
3.2 ขั้นตอนในการดำเนินงาน	21
3.2.1 ศึกษสภาวะที่เหมาะสมในการหมักคอมบูชา โดยศึกษาชนิดของชา ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส	21
3.2.2 การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อโรคในทางเดินอาหาร	23
3.3 การวิเคราะห์ทางสถิติ	24
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	**25**
4.1 ผลการศึกษาชนิดของชาและความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นที่เหมาะสมในการหมักคอมบูชา	25
4.1.1 ค่าพีเอชของคอมบูชา	25
4.1.2 ปริมาณน้ำตาลซูโครส	25
4.1.3 ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติก	30
4.1.4 ผลผลิตเซลลูโลส	
4.2 ผลการทดลอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์	36
4.2.1 ปริมาณเอทานอล	41
4.3 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด	42
4.4 การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีดีพีพีเอช	48
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	55
เอกสารอ้างอิง	57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 ค่าพีเอชจากการหมักชาอู่หลง ชาดำ และชาเขียวที่มีความเข้มข้นซูโครสที่แตกต่างกัน ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน	26
4.2 ปริมาณน้ำตาลซูโครสจากการหมักชา 3 ชนิด ที่มีความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นแตกต่าง หมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน	28
4.3 ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติกในคอมบูชาที่ได้จากการหมักชาชนิดต่างๆ มีความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสที่แตกต่าง หมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน	31
4.4 ผลผลิตเซลลูโลสที่ได้จากการหมักคอมบูชาจากชาชนิดต่างๆที่มีความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสที่แตกต่างกัน หมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน	33
4.5 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารของชาหมักที่มีชนิดของชา และความเข้มข้นซูโครสที่แตกต่างกันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยวิธี Agar diffusion	38
4.6 ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักชาดำ และชาเขียว ที่มีความเข้มข้นซูโครสที่แตกต่างกันหมักเป็นเวลา 10 วัน	41
4.7 ปริมาณฟีนอลิกในคอมบูชาจากการหมักชาดำ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน	43
4.8 ปริมาณฟีนอลิกในคอมบูชาจากการหมักชาเขียว ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน	44
4.9 ปริมาณฟีนอลิกในคอมบูชาจากการหมักชาอู่หลง ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน	45
4.10 ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชของชาหมักคอมบูชาจากการหมักชาดำ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน	49
4.11 ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชของชาหมักคอมบูชาจากการหมักชาเขียว ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน	50
4.12 ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชของชาหมักคอมบูชาจากการหมักชาอู่หลง ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน	51

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 แสดงลักษณะของเครื่องดื่มคอมบูชา	4
2.2 แสดงโครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส	5
2.3 แสดงลักษณะของเชื้อ *Acetobacter*	6
2.4 เซลล์ของ *Saccharomyces cerevisiae*	8
2.5 แสดงกระบวนการผลิตชาเขียว ชาอู่หลง และชาดำ	13
4.1 ค่าพีเอชของการหมักชาอู่หลง ชาดำ และชาเขียวที่มีความเข้มข้นซูโครสแตกต่างกัน หมักในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน	27
4.2 ปริมาณน้ำตาลซูโครสการหมักชาอู่หลง ชาดำ และชาเขียวที่มีความเข้มข้นซูโครสเริ่มต้นแตกต่างกัน หมักในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน	29
4.3 ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติกในคอมบูชาจากการหมักชาอู่หลง ชาดำ และชาเขียว ที่ความเข้มข้นซูโครสแตกต่างกัน หมักเป็นเวลา 10 วัน	32
4.4 ผลผลิตเซลลูโลส ที่ได้จากการหมักชาชนิดต่างๆ ในวันที่ 10 โดยมีความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นที่แตกต่างกัน	34
4.5 ลักษณะเซลลูโลสที่ได้จากการหมักของชา 3 ชนิดได้แก่ ชาอู่หลง ชาดำ และชาเขียวที่มีความเข้มข้นซูโครสร้อยละ 10 15 และ20	35
4.6 ฤทธิ์ของคอมบูชาที่ได้จากการหมักชาดำต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus, S. aureus, L. monocytogenes, E.coli, P. aeruginosa, S. typhimoria* และ *V. parahaemolyticus*	39
4.7 ฤทธิ์ของคอมบูชาที่ได้จากการหมักชาเขียวต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus, S. aureus, L. monocytogenes, E.coli, P. aeruginosa, S. typhimoria* และ *V. parahaemolyticus*	40
4.8 ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมัก ชาดำ และชาเขียวที่มีความเข้มข้นซูโครสต่างกันหมักเป็นเวลา 10 วัน	42
4.9 ปริมาณฟีนอลิกในคอมบูชาจากการหมัก (A) ชาดำ (B) ชาเขียว (C) ชาอู่หลง ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน	46
4.10 เปรียบเทียบปริมาณฟีนอลทั้งหมดในคอมบูชาจากการหมักชาชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิห้องในวันที่ 10	47
4.11 ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชของชาหมักคอมบูชา (A) ชาดำ (B) ชาเขียว (C) ชาอู่หลง ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน	52
4.11 เปรียบเทียบร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชของชาหมักคอมบูชาชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิห้อง ในวันที่ 10	53
4.13 แสดงร้อยละการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอช ในวันที่ 10 ของการหมักคอมบูชาจากชาดำ ชาเขียว และชาอู่หลง ในวันที่ 10	54

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

เครื่องดื่มคอมบูชาเป็นน้ำหมักชีวภาพชนิดหนึ่ง ซึ่งเกิดจากการหมักชาจนเกิดเป็นแผ่นวุ้นขึ้น เชื้อจุลินทรีย์ที่มีบทบาทในกระบวนการหมัก คือ แบคทีเรียและยีสต์ โดยแบคทีเรียที่พบเป็นชนิดที่ต้องการอากาศในการเจริญและสามารถสร้างเซลลูโลส ยีสต์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการหมัก คือ ยีสต์ที่ผลิตแอลกอฮอล์ Liu และคณะ (1996) ที่ได้ศึกษาการแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้หมักคอมบูชาในประเทศไต้หวัน 3 แหล่ง ได้แก่ Taipei, Hsinchu และ Chiayi พบว่ามีกลุ่มแบคทีเรีย เช่น *Acetobacter aceti, A. xylinum* และ *A. pasteurianus* สำหรับยีสต์จำแนกได้เป็น *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces balilii* โดยยีสต์กลุ่มนี้มีความสำคัญในอุตสาหกรรมการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์และอาหารหมัก ซึ่งมีคุณสมบัติเด่น คือ สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีความเป็นกรดสูงและมีน้ำตาลสูง นอกจากนี้ยังอาจพบยีสต์ชนิดอื่นบ้างแต่ไม่ค่อยมีความสำคัญต่อกระบวนการหมัก เช่น *Candida tropicalis, Debaryomyces hansenii* เป็นต้น เครื่องดื่มคอมบูชาได้มีการบริโภคมาเป็นเวลานาน และเป็นที่นิยมในคนที่สนใจด้านอาหารและเครื่องดื่มสุขภาพ โดยรสชาติชาหมักจะมีรสหวานเล็กน้อยและมีรสออกเปรี้ยว คล้ายกับเครื่องดื่มไซเดอร์ (cider) เนื่องจากมีส่วนผสมของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และแอลกอฮอล์ปนอยู่ด้วยและมีสารที่เป็นองค์ประกอบสำคัญในชาหมัก คือ ฟรุกโตส กรดอะซิติก กรดกลูโคนิค และสารดีแซคคาริก แอซิด 1, 4 แลคโตน (D-saccharic acid – 1, 4 – lantone, DSL) เป็นสารที่ช่วยส่งเสริมให้ตับขับสารพิษ นอกจากนี้พบว่ามีเอทิลกลูโคเนต (ethyl gluconate) กรดออกซาลิค (oxalic acid) กรดซัคซินิค (succinic acid) และกรดคาร์บอนิก (carbonic acid) อยู่บ้าง รวมทั้งมีวิตามินและเกลือแร่ต่างๆ ที่จำเป็นต่อร่างกายอีกหลายชนิด

การดื่มชาหมักหรือคอมบูชามีผลดีต่อสุขภาพและสามารถสร้างภูมิป้องกันโรค คือ ช่วยต้านมะเร็ง ต้านการเกิดเนื้องอก ต้านการเกิดออกซิเดชัน ช่วยลดการอักเสบ และมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค (Greenwalt, 2000 ; Dufersne และ Farnworth, 2000)

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการหมักคอมบูชาโดยใช้ชาชนิดต่างๆ และความเข้มข้นของซูโครส ซึ่งมีผลต่อคอมบูชาที่ผลิตได้ จากนั้นศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหาร และฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระของชาที่หมักได้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ศึกษากระบวนการหมักคอมบูชาโดยใช้ชาชนิดต่างๆ เช่น ชาดำ ชาเขียว และชาอูหลง รวมทั้งความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมในชาแต่ละชนิด
2. ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งจากเจริญของจุลินทรีย์ และฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระของชาที่หมักได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ศึกษาการหมักคอมบูชาโดยใช้ชาชนิดต่างๆ และศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมที่ทำให้ได้ผลผลิตเซลลูโลสสูง และชาที่หมักได้มีปริมาณกรดอะซิติกสูง จากนั้นนำชาที่หมักได้มาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร และศึกษาฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระของชาที่หมักได้

1.4 วิธีดำเนินการวิจัย

แบ่งเป็นขั้นตอน ดังนี้

ขั้นที่ 1 ศึกษาการหมักคอมบูชาโดยใช้ชาชนิดต่างๆ และความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสที่แตกต่าง เพื่อดูว่าชาชนิดใดและความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมที่ทำให้ได้น้ำหนักคอมบูชามีปริมาณกรดอะซิติก และผลผลิตของเซลลูโลสสูง เพื่อนำมาใช้ในการศึกษาในหัวข้อต่อไป

1.1 เตรียมหัวเชื้อ (starter) : นำน้ำสะอาดปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ต้มให้เดือด นำชาดำที่ห่อด้วยผ้าขาวบาง 4 กรัม ใส่ในน้ำต้มจนเดือด เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำชาออก และเติมน้ำตาลซูโครส (น้ำตาลทราย) 70 กรัม (ร้อยละ 7 น้ำหนักต่อปริมาตร) คนให้น้ำตาลละลาย ทิ้งให้เย็น นำน้ำชาใส่ในโหลแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เติมน้ำชาปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เติมแผ่นเซลลูโลสเก่าลงในน้ำชาร้อยละ 3 ของน้ำหนักเปียก (30 กรัม) และเติมส่วนที่เป็นน้ำหมักเดิมร้อยละ 10 ปริมาตรต่อปริมาตร (100 มิลลิลิตร) ปิดปากโหลด้วยฝ้าขาวบาง บ่มที่อุณหภูมิห้อง (.30 + 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10 – 12 วัน

1.2 การหมักคอมบูชา ศึกษาชนิดของชาและความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสม โดยกระบวนการหมักเหมือนการเตรียมหัวเชื้อที่กล่าวมาแล้วในข้างต้น โดยใช้ชา 3 ชนิด ในการหมัก คือ ชาดำ ชาเขียว และชาอู่หลง ศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส โดยใช้ความเข้มข้นร้อยละ 10 15 และ 20 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ หมักเป็นเวลา 10 วัน เก็บตัวอย่างในวันที่ 0 2 4 6 8 และ 10 วิเคราะห์ค่าพีเอชของน้ำหมักปริมาณกรดทั้งหมด (ในรูปกรดอะซิติก) ปริมาณน้ำตาลซูโครสโดยดัดแปลงวิธี DNS method ผลผลิตเซลลูโลสที่ได้จากการหมัก และปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้โดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ

ขั้นที่ 2 ศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในทางเดินอาหารบางชนิด

2.1 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ

โดยการถ่ายเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ Vibrio parahaemolyticus, Salmonella typhimurium, E.coli, Pseudomonas aeruginusa, Bacillus cereus, Staphylococcus aureus และ Listeria monocytogenes ลงในอาหาร Mueller Hinton Broth (MHB) และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 – 48 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียที่เจริญในอาหาร MHB streak ลงบนอาหาร Mueller Hinton Agar (MHA) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 – 48 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร MHA ใช้ปลายลูปแตะเชื้อมาเพียงเล็กน้อยใส่ลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้นร้อยละ 0.9 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำมาปรับความขุ่นให้เท่ากับความขุ่นของ Mcfarland standard No. 0.5 ซึ่งจะได้เซลล์แขวนลอยที่มีความหนาแน่นประมาณ 1.5 x 108 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของน้ำหมักคอมบูชาโดยวิธี Agar diffusion

เตรียมอาหาร MHA ในจานเพาะเชื้อ ใช้ไม้พันสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจุ่มในเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียที่มีความหนาแน่น 1.5 x 108 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทา (swab) ให้ทั่วอาหาร MHA ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ จากนั้นเจาะหลุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร บนอาหาร MHA ด้วย cork borer ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จำนวน 8 หลุม/จานเพาะเชื้อ ใช้ไมโครปิเปตดูดสารตัวอย่างที่จะนำมาทดสอบปริมาณ 50 ไมโครลิตร หยดในหลุม โดยมีสารตัวอย่างดังนี้ ชาดำที่ไม่ผ่านการหมัก ชาดำที่เติมน้ำตาลซูโครสร้อยละ 15 ชาดำที่เติมน้ำตาลซูโครสร้อยละ 20 ชาเขียวที่เติมน้ำตาลซูโครสร้อยละ 15 ชาเขียวที่เติมน้ำตาลซูโครสร้อยละ 20 ชาเขียวที่ไม่ผ่านการหมัก ยาปฏิชีวนะ Gentamycin ใช้เป็น positive control สำหรับแบคทีเรียแกรมลบ และยาปฏิชีวนะ Vancomycin ใช้เป็น positive control สำหรับแบคทีเรียแกรมบวก จากนั้นนำจานเพาะเชื้อบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดสอบเชื้อละ 5 ซ้ำ ตรวจผลโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณโซนใสโดยใช้เวอร์เนียคาลิปเปอร์

ขั้นที่ 3 ศึกษาฤทธิ์ในการต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (antioxidant) ของน้ำหนักคอมบูชา

3.1 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิค

ใช้วิธีการของ Singleton, Orthofer และ Lamuela – Raventos (1999) โดยใช้น้ำหมักคอมบูชา 0.1 ml ใส่ใน flask ขนาด 100 ml และปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 46 ml โดยใช้น้ำกลั่น จากนั้นเติม Folin – Ciocalteau reactive solution 1 ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที เติม 2% sodium carbonate (Na_2CO_3) 3 ml ผสมให้เข้ากันโดยนำไปเขย่าในเครื่องเขย่าเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 nm. Gallic acid ใช้เป็นสารมาตรฐานในการทำกราฟมาตรฐาน ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกแสดงในรูป gallic acid equivalent (GAE) หน่วยเป็นไมโครกรัม

3.2 การวิเคราะห์ DPPH scavenging ability

ใช้วิธีการของ Blois (1958) โดยมีการดัดแปลงเล็กน้อยดังนี้ นำชาหมัก 100 ไมโครลิตร ผสมกับ 0.1 mM DPPH (ที่ละลายในเอทานอล) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ 50 mM Tris – HCl buffer (pH 7.4) ปริมาตร 450 ml. นำสารละลายบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที การลดลงของ DPPH free – radicals วัดได้จากการอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm ใช้หลอดที่ไม่ได้เติมชาหมักเป็นชุดควบคุม กิจกรรมของ % DPPH radical scavenging คำนวณตามสมการดังนี้

DPPH radical scarenging activity (%) = [(ค่า OD ของชุดควบคุม – OD ของตัวอย่าง)/ OD ของชุดควบคุม] X 100

ขั้นที่ 4 สรุปผลการทดลองและจัดทำรายงาน

1.5 สมมุติฐานงานวิจัยและกรอบแนวคิดของโครงงานวิจัย

Chen และ Liu (2000) ศึกษาการเตรียมชาหมักหรือชาเห็ด หรือคอมบูชา ทำโดยต้มน้ำกลั่น 1 ลิตร เติมน้ำตาลซูโครส 100 กรัม และชา 2 ซอง (ชาลิปตัน) คนให้เข้ากันต้มเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำถุงชาออก จะได้ชาดำที่มีรสหวาน นำมาใส่ในโหลแก้วขนาด 500 มิลลิลิตร เติมน้ำชาที่ได้ลงไป 250 มิลลิลิตร ทิ้งให้เย็น จากนั้นเติมแผ่นเซลลูโลส (ร้อยละ 2.5 น้ำหนักต่อปริมาตรของน้ำหนักเปียก) และน้ำหมัก (ร้อยละ 20 ปริมาตรต่อลิตร) ปิดปากโหลแก้วด้วยผ้าขาวบางที่สะอาด บ่มที่อุณหภูมิ 24 + 3 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ น้ำหมักที่ได้บางส่วนสามารถนำไปใช้เป็นหัวเชื้อในการหมักครั้งต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Teoh และคณะ (2004) พบว่าคอมบูชาเป็นเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพที่บริโภคกันมาตั้งแต่หลายพันปีของประเทศตะวันออก และยังคงนิยมมาจนถึงปัจจุบันในประเทศตะวันตก ปัจจุบันคอมบูชาได้รับความสนใจมากขึ้นในด้านผลิตภัณฑ์ที่ช่วยในการลดน้ำหนัก ตลอดจนการรักษาโรคมะเร็งและเอดส์ มีแบคทีเรียที่มีบทบาทในกระบวนการหมัก เช่น Acetobacter spp. โดยเฉพาะอย่างยิ่งสายพันธุ์ที่ผลิตเซลลูโลส เช่น Acetobacter xylinum และอาจพบ Gluconobacter spp. และ Lactobacillus spp นอกจากนี้ยังพบยีสต์ที่ประกอบด้วย Candida, Kloeckera, Pichia, Saccharomyces, Saccharomycoides, Schizosaccharomyces, Torulospora และ Zygosaccharomyces

Malbasa และคณะ (2008) พบว่าคอมบูชาเป็นชาหมักที่มีรสเปรี้ยวเป็นผลผลิตที่เกิดจากการหมักของชาดำ สารที่ได้จากการหมักของคอมบูชา ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว กรดอินทรีย์หลายชนิด และวิตามิน นอกจากยังมีสารอื่นที่เป็นผลมาจากการเกิดปฏิกิริยา โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดอินทรีย์ ที่เป็นองค์ประกอบในการหมักชา ซึ่งมีทั้งประโยชน์และมีผลกระทบต่อสุขภาพของคนเรา

Steinkraus และคณะ (1997) ได้ศึกษาสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของชาหมักคอมบูชาในการศึกษานี้จะมุ่งเน้นการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยวิธี Absorbent disc method ในชาหมักที่มีปริมาณกรดทั้งหมด 33 กรัมต่อลิตร (มีกรดอะซิติก 7 กรัมต่อลิตร) สามารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบได้ เช่น *Agrobacterium tumefaciens, Bacillus circus, Salmonella chloleraesuis serotype typhimurium, Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli*

Sreeramulu และคณะ (2000) พบว่าคอมบูชาที่หมักจากชาดำเป็นเวลา 14 วัน มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ Candida albicans ได้ในวันที่ 6 ของการหมัก

Sreeramula และคณะ (2000) ศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของคอมบูชา พบว่าพีเอชของคอมบูชาลดลงอย่างต่อเนื่องจาก 5.0 ถึง 2.5 ในระหว่างการหมัก และค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นจนถึงวันที่สี่ หลังจากนั้นจะคงที่ ปริมาณกรดอะซิติกจะเพิ่มขึ้นจนถึงวันที่สี่ หลังจากนั้นจะลดลง ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อโรค พบว่าจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบมีความไวต่อน้ำหมักคอมบูชา การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า มีสารประกอบอีกมากมายที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์มากกว่า กรดอะซิติกและโปรตีนขนาดใหญ่ในคอมบูชา

Battikn และคณะ (2011) ศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของคอมบูชาระหว่างการหมักชาเขียวและชาดำเป็นเวลา 21 วัน พบว่าน้ำหมักคอมบูชามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบ ยกเว้น Candada krusei ชาเขียวมีประสิทธิภาพสูงสุด โดยมีปริมาณที่ถูกยับยั้งขนาดใหญ่ในเชื้อ Staphylococcus epidermidis (22 มิลลิเมตร) Listeria monocytogenes (22 มิลลิเมตร) และ Micrococcus luteus (21.5 มิลลิเมตร)

เอกสารอ้างอิงของโครงงานวิจัย

Battikh, H., Chieb, K., Bakhrouf, A and Ammar, E. 2011. Antibacterial and activities of black and green kombucha Teas. J. of Food Biochemistry. 37 : 231 – 236.

Blois, M.S. 1996. Characterization of tea fungus metabolites. Biotechnology Letters, 18(2), 139 – 142.

Chen, C., and Liv, B. Y. 2000. Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. J. Appl. Microbiol. 89, 834 – 839.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Dufresne, C., and Farnworth, E. 2000. Tea, Kombucha and health : A review. Food Res. Intern. 33, 409- 421.

Greenwalt, C. J., Ledford, R.A. and Steinkraus, K.H. 1998. Determination and characterization of the antimicrobial activity of the fermented tea kombucha. Lebensm. Wiss. Technol. 31 : 291 – 296.

Liu, C.H., Hsu, S.H., Lee, F.L., Liao, C.C. 1996. The isolation and identification of microbes from fermented tea beverage, Haipao, and their interactions during Haipao fermentation. Food Microbiology J. 13(6) : 407 – 415.

Malbasa, R., Loncar, E and Djuric, M. 2008. Comparison of the products of kombucha fermentation on sucrose and molasses. Food Chem. 106, 1039 – 1045.

Singleton, V.L., Orthofer, R and Lamuela – Raventos, R.M. 1999. Analysis of total polyphenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin – Ciocalteau reagent. Methods in Enzymology, 299, 152 – 178.

Sreeramulu, G., Zhu, Y and Knol, W. 2000. Kombucha fermentation and its antimicrobial activity. J. Agric. Food. Chem. 48, 2589 – 2594.

Steinkraus, K.H., Shapiro, K.B., Hotchkiss, J.H and Mortlock, R.P. 1996. Investigations into the antibiotic acitivity of tea fungus/kombucha beverage. Acta Biotechnol. 16, 199 – 205.

Teoh, A.L., Heardb, G and Cox, J. 2004. Yeast ecology of kombucha fermentation. Int. J. Food Microbiol. 95, 119 – 126.

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทำให้รู้ชนิดของชา และความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมต่อการหมักคอมบูชา รวมถึงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารของคอมบูชาที่หมักได้ อีกทั้งเป็นแนวทางในการปรับปรุงและพัฒนาการผลิตเครื่องดื่มคอมบูชาในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 คอมบูชา (Kombucha)

2.1.1ความเป็นมาของคอมบูชา

สมัยราชวงศ์จิ้น พ.ศ. 212 ในสมัยนั้นเรียกน้ำหมักชีวภาพชนิดนี้ว่า ชาเห็ดแดง ซึ่งเชื่อกันว่าเป็น ชาอมฤต ที่เกิดจากการหมักชาจนเกิดเป็นแผ่นวุ้นขึ้น เนื่องจากแผ่นวุ้นมีลักษณะคล้ายเห็ดแดงจึงเรียกว่าเห็ดแดง จากนั้นความรู้นี้ได้เผยแพร่ไปยังประเทศเกาหลี ใน ค.ศ. 414 โดยนายแพทย์ชื่อ คอมบู ซึ่งได้นำชาหมักถวายแก่พระจักรพรรดิแห่งญี่ปุ่นโดยเชื่อว่า สามารถรักษาได้สารพัดโรค จึงถูกเรียกว่า คอมบูชา และความเชื่อนี้ได้แผ่ขยายไปยังอินเดียและรัสเซีย ได้รับความนิยมในหมู่ผู้สนใจด้านแพทย์ทางเลือกจนได้รับความนิยมอย่างสูงในยุโรป ช่วง ค.ศ.ที่ 19 ในฐานะชาหมักเพื่อสุขภาพ และได้แผ่ขยายไปจนถึงประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งในขณะนั้นมีแอปเปิ้ลเป็นจำนวนมาก จึงนำแอปเปิ้ลมาหมัก พบว่ามีรสชาติดีจนเป็นที่นิยมแพร่หลายในชื่อว่า แอปเปิ้ลไซเดอร์ (http://yaamata.blogspot.com/2011/10/kombucha.html, 25 มกราคม 2558)

2.1.2 เครื่องดื่มชาหมักคอมบูชา (Kombucha) (สายสมร, 2557)

เครื่องดื่มคอมบูชาเป็นน้ำหมักชีวภาพชนิดหนึ่ง ซึ่งเกิดจากการหมักชาจนเกิดเป็นแผ่นวุ้นขึ้น เครื่องดื่มคอมบูชานั้นได้มีการบริโภคมาเป็นเวลานาน และเป็นที่นิยมในหมู่ผู้ที่สนใจด้านอาหารและเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ โดยรสชาติของชาหมักจะมีรสหวานเล็กน้อยและมีรสออกเปรี้ยวคล้ายกับเครื่องดื่มไซเดอร์ (Cider) เนื่องจากมีส่วนผสมของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และแอลกอฮอล์ปนอยู่ด้วย และมีสารที่เป็นองค์ประกอบที่สำคัญในเครื่องดื่มชาหมัก คือ ฟรุกโตสกรดอะซิติก กรดกลูโคนิค และสารดีแซคคาริก แอซิด 1,4 แลคโตน (D-saccharic acid-1,4-lactone, DSL) เป็นสารที่ช่วยส่งเสริมให้ตับขับสารพิษ นอกจากนี้ยังพบว่ามีเอทิลกูลโคเนต (ethyl-gluconate) กรดออกซาลิค (oxalic acid) กรดแซคาริก (saccharic acid) กรดคีโตไกลโคนิค (ketoglyconic acid) กรดซัคซินิค (succinic acid) และกรดคาร์บอนิก (carbonic acid) ในปริมาณเล็กน้อย รวมทั้งมีวิตามินและเกลือแร่ต่างๆ ที่จำเป็นต่อร่างกายอีกหลายชนิด

รูปที่ 2.1 แสดงลักษณะของเครื่องดื่มคอมบูชา

ที่มา : http://4.bp.blogspot.com/-SQ2bYTpbigA/TqlGKTsH64I/AAAAAAAAAAU/1-HwB6JkeeU/s1600/Kombucha_Mature.jpg (8 กันยายน2557)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การดื่มชาหมักจะมีผลดีต่อสุขภาพและสามารถสร้างภูมิป้องกันโรคคือ ช่วยต้านมะเร็ง ต้านการเกิดเนื้องอก ต้านการเกิดออกซิเดชัน ช่วยลดการอักเสบ และยังมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค (Greenwalt, 2000; Dufresne และ Farnworth, 2000; http://www.happyherbalist.com; http://w3.trib.com/~kombu/FAQ)

2.2 จุลินทรีย์ที่พบในชาหมักคอมบูชา (พรรัตน์, 2550)

กลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่มีบทบาทและความสำคัญในการหมักชาคอมบูชาคือ กลุ่มแบคทีเรียและยีสต์ โดยกลุ่มแบคทีเรียที่พบเป็นชนิดต้องการอากาศในการเจริญเติบโต และสามารถสร้างเซลลูโลสที่มีลักษณะเป็นแผ่นคล้ายเห็ดกลุ่มยีสต์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการหมัก คือ กลุ่มยีสต์ที่สามารถผลิตสารแอลกอฮอล์ (Greenwalt และคณะ, 2000; Liu และคณะ, 1996) และยังมีงานวิจัยที่ได้ทำการศึกษาการแยก เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตชาหมักจากแหล่งผลิตในประเทศไต้หวัน 3 แหล่ง (Liu และคณะ, 1996) ได้แก่ Taipei, HsinchuและChiayiพบว่ามีกลุ่มแบคทีเรีย *Acetobacter*และยีสต์ เมื่อนำเชื้อจุลินทรีย์ทั้งสองกลุ่มที่ได้มาจำแนกโดยอาศัยความแตกต่างของคุณสมบัติทางชีวเคมีและทางสรีรวิทยาพบว่า เป็นแบคทีเรียกลุ่ม *A. aceti, A. xylinum* และ*A. pasteurianus*ซึ่งมีคุณสมบัติเฉพาะคือสามารถผลิตเซลลูโลสได้ ส่วนยีสต์ที่จำแนกได้ คือ *Saccharomyces cerevisae* และ *Zygosaccharomycesbalilii* ยีสต์กลุ่มนี้ล้วนแต่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์และอาหารหมัก ซึ่งมีคุณสมบัติเด่นคือ สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีความเป็นกรดสูงและมีน้ำตาลสูง นอกจากนี้อาจพบยีสต์ชนิดอื่นบ้างแต่ไม่ค่อยมีความสำคัญกับกระบวนการหมัก ได้แก่ *Candida tropicalis, Debaryomyceshansenii, Torulopsisfamata* และ *Pichiamembranefacience* เป็นต้น

2.2.1 แบคทีเรียเซลลูโลส (Bacterial cellulose)

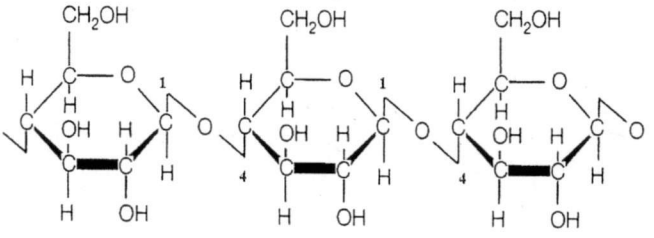
เซลลูโลสจากแบคทีเรียได้ถูกค้นพบเมื่อปี ค.ศ. 1886โดย Brown พบว่าแบคทีเรียสามารถผลิตเซลลูโลสได้ และเรียกแบคทีเรียกลุ่มนี้ว่า Bacterial Cellulose (BC) Producer ซึ่งแบคทีเรียในกลุ่มนี้ ได้แก่ *Acetobacter, Achomobacter, Aerobacter, Agrobacterium, Alcaligenes, Azotobacter, Pseudomonas Rhizobium และ Sarcina (Deinemaและ Zevenhuizen*, 1971)

เซลลูโลสจากแบคทีเรีย (Bacterial cellulose) เป็นชีววัสดุธรรมชาติที่ได้รับความสนใจและศึกษากันอย่างแพร่หลาย รู้จักกันดีในชื่อ Nata de Coco หรือ วุ้นมะพร้าว หรือ วุ้นสวรรค์ ผลิตจากแบคทีเรีย *Acetobacterxylinum* โครงสร้างประกอบด้วยหน่วยย่อยที่เรียกว่าไมโครไฟบริล (microfibril) ซึ่งประกอบด้วยหน่วยย่อยของกลูโคสประมาณ 2,000-18,000 หน่วย มีขนาดเล็กกว่าเส้นใยของพืชชั้นสูง และเส้นใยสังเคราะห์ประมาณ 10-1,000 เท่า และ 100เท่า ตามลำดับ มีความบริสุทธิ์สูง มีปริมาณเซลลูโลสต่อน้ำหนักเปียกประมาณร้อยละ1.0ซึ่งมากกว่าเซลลูโลสที่ได้จากพืช

แบคทีเรียเซลลูโลสเป็นคาร์โบไฮเดรตชนิดโฮโมโพลีแซคคาไรด์เชิงเส้น ประกอบด้วยหน่อยย่อยของกลูโคส เชื่อมต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะ β-1,4 glycosidic bondจากการศึกษาโดยใช้การหักเหรังสีเอกซ์ (X-ray diffraction) โมเลกุลของเซลลูโลสอยู่ในลักษณะเป็นเส้นยาวเรียงขนานกัน แต่ละเส้นจะเชื่อมกันด้วยพันธะไฮโดรเจน รวมกันอยู่เป็นมัด มีลักษณะเป็นเส้นใยเล็กๆ เรียกว่าไฟบริล (fibril) (Haigler, 1985) แบคทีเรียลเซลลูโลสไม่ละลายในสารละลายด่างและกรดที่อุณหภูมิห้อง แต่ละลายในสารละลายกรดที่มีความเข้มข้นสูงที่อุณหภูมิ 120-130 องศาเซลเซียส เส้นใยเซลลูโลสที่ได้จากแบคทีเรีย มีโครงสร้างและคุณสมบัติเฉพาะที่แตกต่างจากเส้นใยเซลลูโลสจากพืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อ *Acetobacter* sp. สามารถผลิตเส้นใยเซลลูโลส โดยเส้นใยเหล่านี้จะเจริญอยู่บริเวณผิวหน้าของอาหารเหลว (liquid culture) ถ้าเปรียบเทียบโครงสร้างและวิถีของการสังเคราะห์พบว่าเส้นใยจากแบคทีเรียจะประกอบด้วยเส้นใยเล็ก ๆ มากมายเชื่อมกันเป็นร่างแห ซึ่งต่างจากเส้นใยจากพืชแสดงดังรูปที่ 2.2 (พิมพ์เพ็ญ และคณะ, 2554)



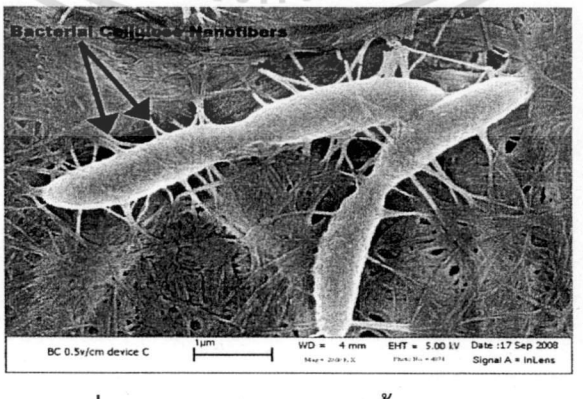
รูปที่ 2.2 แสดงโครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส

ที่มา : http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/0612/cellulose (8 กันยายน 2557)

2.2.1.1 ลักษณะของเชื้อ *Acetobacter*

เชื้อ *Acetobacter* ลักษณะทั่วไปคือ มีรูปร่างตั้งแต่รูปไข่จนกระทั่งรูปร่างแท่งตรงหรือโค้งงอเล็กน้อยติดสีแกรมลบ เซลล์มีขนาดกว้าง x ยาว ประมาณ 0.6-0.8 x 1.0-1.4 ไมโครเมตร มักอยู่แบบเดี่ยว เป็นคู่หรือเป็นสายโซ่ เซลล์มีทั้งเคลื่อนที่ได้และไม่ได้ ไม่พบการสร้างเอนโดสปอร์ เป็นแบคทีเรียที่ต้องการอากาศ แสดงดังรูป 2.3 เมแทบอลิซึมเป็นแบบใช้ออกซิเจน โคโลนีมีสีขาวหรือมีสีชมพูจากสาร Porphyrins ที่สร้างขึ้น ไม่สามารถย่อยเจลาตินและไม่สร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์สามารถออกซิไดซ์เอทานอลให้กลายเป็นกรดอะซิติกได้ ซึ่งกรดอะซิติกจะถูกออกซิไดซ์ต่อให้กลายเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำ สามารถใช้เอทานอล กลูโคสและกลีเซอรอลเป็นแหล่งของคาร์บอนเพื่อการเจริญได้

แบคทีเรียอยู่ในกลุ่มของ Chemoorganotroph สามารถเจริญได้ดีในอุณหภูมิระหว่าง 25-30 องศาเซลเซียส และพีเอชที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตอยู่ระหว่าง 5.4-6.3 แบคทีเรียในจีนัส Acetobacter แยกได้จากน้ำส้มสายชู เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เช่น เบียร์ ไวน์ ไซเดอร์และเตกิลลา นอกจากนี้ยังสามารถแยกได้จากผลไม้ เช่น องุ่น ฝรั่ง ซาโปดิลลา มะเฟือง มังคุด มะม่วง กล้วย มะละกอ ดอกไม้ และจากอื่นๆ เช่น น้ำมะพร้าว เมล็ดปาล์มและเต้าหู้ (Kerster และคณะ, 2006)



รูปที่ 2.3 แสดงลักษณะของเชื้อ *Acetobacter*

ที่มา : http://www.vtnews.vt.edu/articles/2008/11/images/M_08680gatenholm-jpg.jpg (8กันยายน 2557)

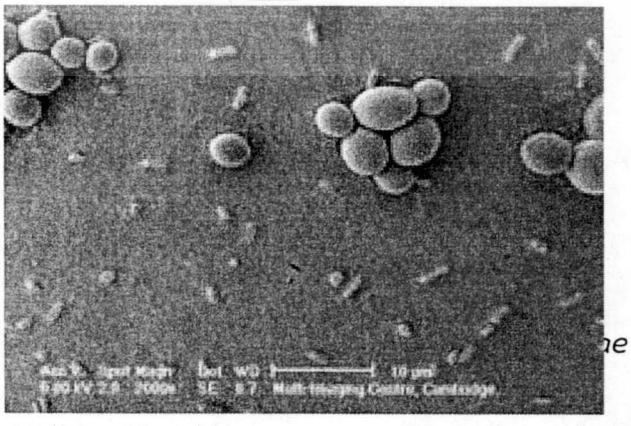
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2 ยีสต์ (yeast)

ยีสต์เป็นสิ่งมีชีวิตในอาณาจักรเห็ดรา (Kingdom Fungi) เช่นเดียวกับเชื้อรา แต่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว (Unicellular) มีขนาด 5-10 ไมครอน เมื่อแตกหน่อและเซลล์ต่อกันเป็นสาย เรียกว่า ซูโดไมซิเลียม (psudomycelium) บางชนิดสร้างเส้นใยที่แท้จริง (true mycelium)เช่นเดียวกับเชื้อรา ยีสต์มีรูปร่างหลายแบบ ทั้งแบบกลม รูปไข่ รูปไข่ปลายแหลม รูปคนโท สามเหลี่ยม ทรงกระบอก และรูปเลมอน ส่วนใหญ่จะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยการแตกหน่อ (budding) สามารถพบยีสต์ได้ทั่วไปในธรรมชาติทั้งในดิน ในน้ำ หรือในส่วนต่างๆ ของพืช ยีสต์บางชนิดอาจพบอยู่กับแมลง หรือแม้แต่ในกระเพาะของสัตว์บางชนิด แต่แหล่งที่พบยีสต์ได้บ่อย คือ แหล่งที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูง เช่น น้ำผลไม้ที่มีรสหวานสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของยีสต์แต่ละชนิด เช่นยีสต์พวก *Saccharomyces* เจริญได้ดีในที่ที่มีน้ำตาลเช่น น้ำหวานของดอกไม้ตามผิวของผลไม้ที่สุกงอมหรือมีตำหนิ ในน้ำผลไม้ที่เกิดการหมัก เป็นต้นนอกจากนี้ยังสามารถพบยีสต์ได้ในผักดอง ผลไม้ดอง และอาหารหมักในบางระยะ

2.2.2.1 ลักษณะของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae เซลล์รูปกลม รูปรีทรงกระบอกหรือยาว สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยการแตกหน่อรอบเซลล์ อาจสร้างซูโดไมซิเลียม แต่ไม่พบไมซิเลียมที่แท้จริง สร้างแอสโคสปอร์ รูปกลมหรือรูปไข่ ผนังเรียบ มีบางชนิดที่ผนังสปอร์อาจมีปุ่ม โดยปกติมีจำนวน 1-4 สปอร์ต่อแอสคัส สปอร์หลุดออกจากแอสคัสได้ยาก ทุกชนิดหมักได้รวดเร็ว ยีสต์พวกนี้จะรวมตัวกันอย่างหลวมๆ ลอยอยู่กับฟองก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ผิวหน้าของการหมัก *S. cerevisiae* สามารถหมักน้ำตาลได้เกือบทุกชนิดโดยเฉพาะ กาแล็กโทส กลูโคส ฟรักโทส และแมนโทส ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและเป็นแหล่งพลังงาน *S. cerevisiae* ไม่สามารถเจริญเติบโตในซูโครสในสภาพไม่มีออกซิเจนได้ สามารถใช้แอมโมเนียซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ ต้องการฟอสฟอรัสสำหรับการเจริญและการหมัก และสามารถใช้โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเป็นแหล่งฟอสเฟตได้ดีกว่า ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ส่วนแหล่งของซัลเฟอร์มักใช้ในรูปซัลเฟต วิตามินเป็นสารช่วยส่งเสริมในการเจริญของ *S. cerevisiae* ต้องการไบโอตินในการเจริญ ซึ่งไบโอตินมีส่วนร่วมในการสร้างสารต่างๆหลายชนิด เช่น การสังเคราะห์โพริดิน นิวคลีโอไทด์ เป็นต้น การขาดไบโอติน มีผลทำให้พลาสมาเมมเบรนจะได้รับความเสียหาย อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตอยู่ระหว่าง 28 - 32 องศาเซลเซียส อุณหภูมิต่ำสุด ในการเจริญเติบโต คือ 0 –5 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูงสุดในการเจริญเติบโต คือ 40 - 42 องศาเซลเซียส ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต พีเอชในการเจริญเติบโตสูงสุด คือ 9.1-9.2 พีเอชต่ำสุด คือ 2.4-2.6



ที่มา : http://pvtridvs.net/pool/users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/Y/Yeast.html (30 สิงหาคม 2557)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 ปฏิกิริยาการเกิดชาหมัก (สนธิรัตน์, 2556)

การหมักของแบคทีเรียและยีสต์เป็นแบบพึ่งพาอาศัยกันในลักษณะเอื้อประโยชน์ต่อกันหรือเรียกว่า stable symbiosis โดยเกิดขึ้นภายใต้บริเวณโครงสร้างที่มีลักษณะเป็นร่างแหเซลลูโลส กิจกรรมการหมักในระยะแรกยีสต์จะทำหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาลซูโครสให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว คือ กลูโคส และฟรุกโตส จากนั้นก็จะเปลี่ยนน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวให้เป็นแอลกอฮอล์ ทำให้สภาวะดังกล่าวมีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกลุ่มแบคทีเรีย *Acetobacter* ที่สามารถเจริญได้ดีพร้อมทั้งผลิตกรดอะซิติก โดยเฉพาะการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Acetobacter xylinum* ที่สามารถให้ทั้งผลผลิตของกรดอะซิติก กรดกลูโคนิค และเซลลูโลส ทำให้ชาหมักที่ได้มีคุณภาพดี ขณะเดียวกันก็จะส่งผลต่อการเร่งการเจริญเติบโตของยีสต์และทำให้ยีสต์ผลิตแอลกอฮอล์ได้มากขึ้น ปริมาณแอลกอฮอล์ที่เพิ่มขึ้นยังสามารถช่วยกระตุ้นให้ *Acetobacter* เจริญและผลิตกรดอะซิติกได้ดีขึ้นเช่นกัน การที่แบคทีเรีย *Acetobacter* สามารถออกซิไดซ์แอลกอฮอล์ไปเป็น acetaldehyde และสารให้กลิ่นรสอื่นๆ เป็นผลให้ชาหมักมีปริมาณแอลกอฮอล์ไม่สูงมากนักเมื่อเทียบกับเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ทั่วไป กรดที่พบในชาหมัก ได้แก่ อะซิติกแลคติก และกลูโคนิค ผลดีของกรดอะซิติก และแอลกอฮอล์ที่มีอยู่ในชาหมักคือ มีคุณสมบัติช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค เช่น *Vibrio parahaemolyticus, Salmonella typhimurium, E.coli, Pseudomonas aeruginosa, Bacillus cereus, Staphylococcus aureus* และ *Listeria monocytogenes* (Battikh และคณะ, 2011)

กระบวนการหมักเพื่อให้ได้กรดอะซิติก เป็นปฏิกิริยา 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนการเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอทิลแอลกอฮอล์และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน โดยยีสต์ที่มีอยู่ในวัตถุดิบที่ใช้ในกระบวนการหมัก ในระยะแรกจะเป็นการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ เขียนเป็นสมการได้ ดังนี้

$$\underset{\text{น้ำตาล}}{C_6H_{12}O_6} \longrightarrow \underset{\text{ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์}}{2CO_2} + \underset{\text{เอทิลแอลกอฮอล์}}{2C_2H_5OH} + \text{พลังงาน}$$

ระยะที่สองเป็นปฏิกิริยาออกซิไดส์เอทิลแอลกอฮอล์ให้เป็นกรดอะซิติกโดยเชื้อแบคทีเรียภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน โดยสามารถเขียนเป็นสมการได้ดังนี้

$$\underset{\text{เอทิลแอลกอฮอล์}}{C_2H_5OH} + \underset{\text{ออกซิเจน}}{O_2} \longrightarrow \underset{\text{กรดอะซิติก}}{CH_3COOH} + \underset{\text{น้ำ}}{H_2O}$$

(ดุษณี, 2555)

2.4 การสังเคราะห์และสะสมเซลลูโลสจากแบคทีเรียโดยเชื้อ *A. xylinum* (สนธิรัตน์, 2556)

การสังเคราะห์เซลลูโลสของ *A. xylinum* จัดเป็นกระบวนการเมแทบอลิซึมขั้นสุดท้ายของการใช้ประโยชน์จากคาร์บอน โดยเกี่ยวข้องกับวิถีpentose phosphate cycle หรือ Kreb's cycle ควบคู่กับกระบวนการ gluconeogenesis แบคทีเรีย *A. xylinum* จัดเป็นแบคทีเรียอะซิติก (acetic acid bacteria) จึงไม่มีกระบวนการ glycolysis เนื่องจากไม่สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ phosphofructose kinase (Ross และคณะ, 1991)

A. xylinum สามารถเปลี่ยนองค์ประกอบของแหล่งคาร์บอนต่างๆ ได้แก่ hexoses, glycerol, dihydroxyacetone, pyruvate และ dicarboxylic acids ไปเป็นเซลลูโลส โดยสารประกอบต่างๆ จะเข้าสู่ Kreb's cycle ในช่วงที่เปลี่ยน oxaloacetate ไปเป็น pyruvate สารตั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ แสดงซ้ำ ดัดแปลง หรือนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต้นของการผลิตเซลลูโลสโดยตรงคือ Uridinediphosphate glucose (UDPGlc) เกี่ยวข้องกับกระบวนการ glucosephosphorylation ที่เปลี่ยนไปเป็น glucose-6-phosphate (Glc-6-P) โดยเอนไซม์ glucokinase ตามด้วย isomerizaion ของสารตัวกลางไปเป็น glc-α-1-P โดยเอนไซม์ phosphoglucomutase และเปลี่ยนไปเป็น UDPGlc โดยเอนไซม์ตัวสุดท้ายคือ UDPGlcpyrophosphorylase เป็นตัวสำคัญในการสังเคราะห์เซลลูโลสและ เซลลูโลสถูกปล่อยสู่อาหารเลี้ยงเชื้อโดยจะมีลักษณะเป็นเส้นใยเจริญอยู่บริเวณผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ (Saxena และคณะ, 1989) การเลี้ยงในสภาวะนิ่งเชื้อ *A. xylinum* จะสังเคราะห์เซลลูโลสออกมามีลักษณะเป็นแผ่นหนาเจริญปกคลุมผิวอาหาร ส่วนการเลี้ยงในสภาวะที่มีการเขย่าการสังเคราะห์เซลลูโลสจะอยู่ในรูปก้อนกลม (Williams และ Cannon, 1989)

2.5 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของเชื้อแบคทีเรียเซลลูโลส

2.5.1 วัตถุดิบที่ใช้ในการหมัก

น้ำชาที่ใช้ในการหมัก ควรเป็นน้ำชาที่ต้มใหม่ เพื่อไม่ให้มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น เนื่องจากจุลินทรีย์บางชนิดอาจมีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก หรืออาจมีการแย่งสารอาหารทำให้จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักใช้สารอาหารได้ไม่เต็มที่

2.5.2 ออกซิเจน

เชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตเซลลูโลสเป็นเชื้อที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญและสร้างแผ่นเซลลูโลส โดยใช้ผ้าขาวบางปิดบริเวณปากขวดโหลเพื่อให้ออกซิเจนสามารถถ่ายเทได้ และเมื่อเชื้อมีจำนวนความหนาแน่นในระดับหนึ่งจะเริ่มสร้างเป็นแผ่นเซลลูโลส แผ่นเซลลูโลสที่ได้จึงอยู่บริเวณด้านบนของขวดโหล เนื่องจากเป็นบริเวณที่มีออกซิเจนมากที่สุด

Kouda และคณะ (1997) ศึกษาผลกระทบของออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ในการผลิตเซลลูโลสของเชื้อ *A. xylinum* พบว่าอัตราการผลิตเซลลูโลสขึ้นอยู่กับอัตราการถ่ายเทออกซิเจน เมื่อเพิ่มความดันออกซิเจนจะไม่ส่งผลกระทบต่อการผลิตเซลลูโลส แต่เมื่อความดันคาร์บอนไดออกไซด์สูงทำให้อัตราการผลิตเซลลูโลสลดลง สามารถแก้ไขได้โดยการเพิ่มอัตราการไหลของอากาศ

2.5.3 ความเป็นกรดด่าง

ในกระบวนการหมักจะมีการปรับพีเอชของน้ำหมัก โดยใช้กรดอะซิติกให้มีพีเอช อยู่ในช่วง 2.7-3.0 เพราะความเป็นกรดจะสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมาได้

2.5.4 อุณหภูมิ

เชื้อ *A. xylinum* ส่วนใหญ่สามารถเจริญและสร้างเซลลูโลสได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส และผลิตเซลลูโลสได้ที่อุณหภูมิระหว่าง 10-40 องศาเซลเซียส ถ้าอุณหภูมิต่ำหรือสูงกว่านี้มาก เชื้อไม่สามารถเจริญได้ (Kouda และคณะ, 1997)

2.5.5 แหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอนของเชื้อสามารถใช้น้ำตาลได้หลายชนิด ซึ่งในการหมักคอมบูชาจะใช้น้ำตาลทรายขาวหรือน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญและสร้างเซลลูโลสของเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 กระบวนการผลิตชา

2.6.1 ชาเขียว

ชาเป็นเครื่องดื่มที่มีกลิ่นหอม คนจึงนิยมดื่มกันอย่างแพร่หลายไม่ว่าจะเป็นชาวเอเชีย เช่น จีน ญี่ปุ่น หรือ ชาวยุโรป ชาที่นิยมดื่มในปัจจุบันอาจแบ่งได้เป็น 3 ชนิดใหญ่ ๆ คือ ชาจีน ชาเขียว และชาฝรั่งซึ่งชาแต่ละชนิดจะต่างกันตรงกรรมวิธีในการผลิต แต่ชาที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพมากก็คือชาเขียว (green tea) ซึ่งเป็นชาที่ไม่ผ่านการหมักทำให้ไม่สูญเสียองค์ประกอบที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพไปในระหว่างการหมักเหมือนชาฝรั่ง ชาเขียวได้จากการทำใบชาให้แห้งที่อุณหภูมิสูง อย่างรวดเร็ว จึงทำให้ใบชาแห้งยังคงมีสีเขียวและมีคุณภาพเช่นเดียวกับใบชาสด ซึ่งเมื่อชงน้ำร้อนแล้วจะได้น้ำชาสีเขียวหรือเหลืองอมเขียว ไม่มีกลิ่น มีรสฝาดกว่าชาจีน นิยมแต่งกลิ่นด้วยพืชหอมเช่น มะลิ บัวหลวง เป็นต้น ชาเขียวมี 2 ประเภทใหญ่ ๆ คือ ชาเขียวแบบญี่ปุ่น และชาเขียวแบบจีน ซึ่งแตกต่างกันตรงที่ชาเขียวแบบจีนจะมีการคั่วด้วยกระทะร้อน แต่ชาเขียวแบบญี่ปุ่นไม่ต้องคั่วใบชาเขียวมีสารอาหารพวกโปรตีน น้ำตาลเล็กน้อย และมีวิตามินอีสูง (นิรมล, 2553)

ผลิตภัณฑ์ชาเขียวได้จากการเก็บใบจากต้นมาตากแห้งหรืออบแห้งโดยไม่ผ่านกระบวนการหมักบ่มใด ๆ ชาเขียวเป็นชาที่ได้รับความนิยมอย่างมาก ประโยชน์ทางการแพทย์ของชาเขียวคือ เป็นตัวกระตุ้นให้ตื่นตัวและช่วยในการย่อยอาหาร โดยจะมีสารประกอบทางเคมีชนิดหนึ่งเรียกว่า โพลีฟีนอล (Polyphenol) สารดังกล่าวเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ซึ่งมีประโยชน์ต่อร่างกาย สามารดูดซึมได้เร็วและกระจายตัวได้ดีในร่างกาย จากการศึกษาจำนวนมากพบว่า การดื่มชาเขียวสามารถลดความเสี่ยงในการเป็นมะเร็งหลายชนิด ชาเขียวสกัดประกอบด้วยสารออกฤทธิ์หลายชนิดที่ช่วยส่งเสริมสุขภาพ ผลการศึกษาวิจัยแสดงว่า ชาเขียวมีสารต้านอนุมูลอิสระอยู่และอาจมีมากกว่าในชาดำ ซึ่งที่เป็นเช่นนี้เพราะระหว่างการหมักบ่มใบชาจะมีการทำลายหรือเสื่อมสลายของสารบางตัวไป นอกจากนี้ชาเขียวสามารถส่งเสริมการรักษาเคมีบำบัดได้ด้วย และยังมีผลดีต่อโรคหัวใจ และช่วยลดระดับไขมันในเส้นเลือดเมื่อเก็บเกี่ยวชาแล้วจะนำไปอบไอน้ำทันทีเพื่อทำลายเอนไซม์ที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidizing enzymes) เช่น polyphenol oxidase และ peroxidase ป้องกันการเกิดกระบวนการหมัก และนำไปตากแดดให้แห้ง ทำให้ใบชายังคงสีเขียวอยู่ ดังนั้นชาเขียวจึงจัดเป็นชาที่ไม่ผ่านการหมัก (nonfermented tea) (ประภัสสร, 2557)

ใบชาเขียวมีสารสำคัญ 2 ชนิด

1. คาเฟอีน (caffeine)

ในชาเขียวมีคาเฟอีนอยู่ร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนัก ซึ่งสารชนิดนี้ทำให้น้ำชาสามารถกระตุ้นให้สมองสดชื่น เนื่องจากคาเฟอีนมีฤทธิ์กระตุ้นประสาท เพิ่มการทำงานของหัวใจและไต ผู้ป่วยโรคหัวใจจึงไม่ควรดื่มชา เนื่องจากคาเฟอีนมีคุณสมบัติในการกระตุ้นประสาทและบีบหัวใจ (นิรนาม, ม.ป.ป, 2010)

2. แทนนิน หรือ ฝาดชา (tea tannin)

พบในใบชาแห้งประมาณร้อยละ 20-30 โดยน้ำหนัก เป็นสารที่มีรสฝาดใช้บรรเทาอาการท้องเสียได้ ดังนั้นหากต้องการดื่มชาเขียวให้ได้รสชาติที่ดีจึงไม่ควรทิ้งใบชาค้างไว้นานเกินไป เพราะแทนนินจะละลายออกมามากทำให้ชาเขียวมีรสขม แต่ถ้าหากดื่มชาเขียวเพื่อจุดประสงค์ในการบรรเทาอาการท้องเสียก็ควรต้มใบชานานๆ เพื่อให้มีปริมาณแทนนินออกมามาก แทนนินยังช่วยเพิ่มความยืดหยุ่นของกล้ามเนื้อหัวใจและขยายผนังหลอดเลือด จึงทำให้ชาเขียวเหมาะสำหรับผู้ที่มีความดันโลหิตสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แทนนิน มี 2 ชนิด คือ condensed tannins พบได้ในส่วนเปลือกต้นและแก่นไม้เป็นส่วนใหญ่ และ hydrolysable tannins พบมากในส่วนใบ ฝัก และส่วนที่ปูดออกมาจากปกติเมื่อต้นไม้ได้รับอันตราย (gall) แทนนินมีคุณสมบัติตกตะกอนโปรตีนทำให้หนังสัตว์ไม่เน่าเปื่อย แทนนินมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ (Todar, 2008)

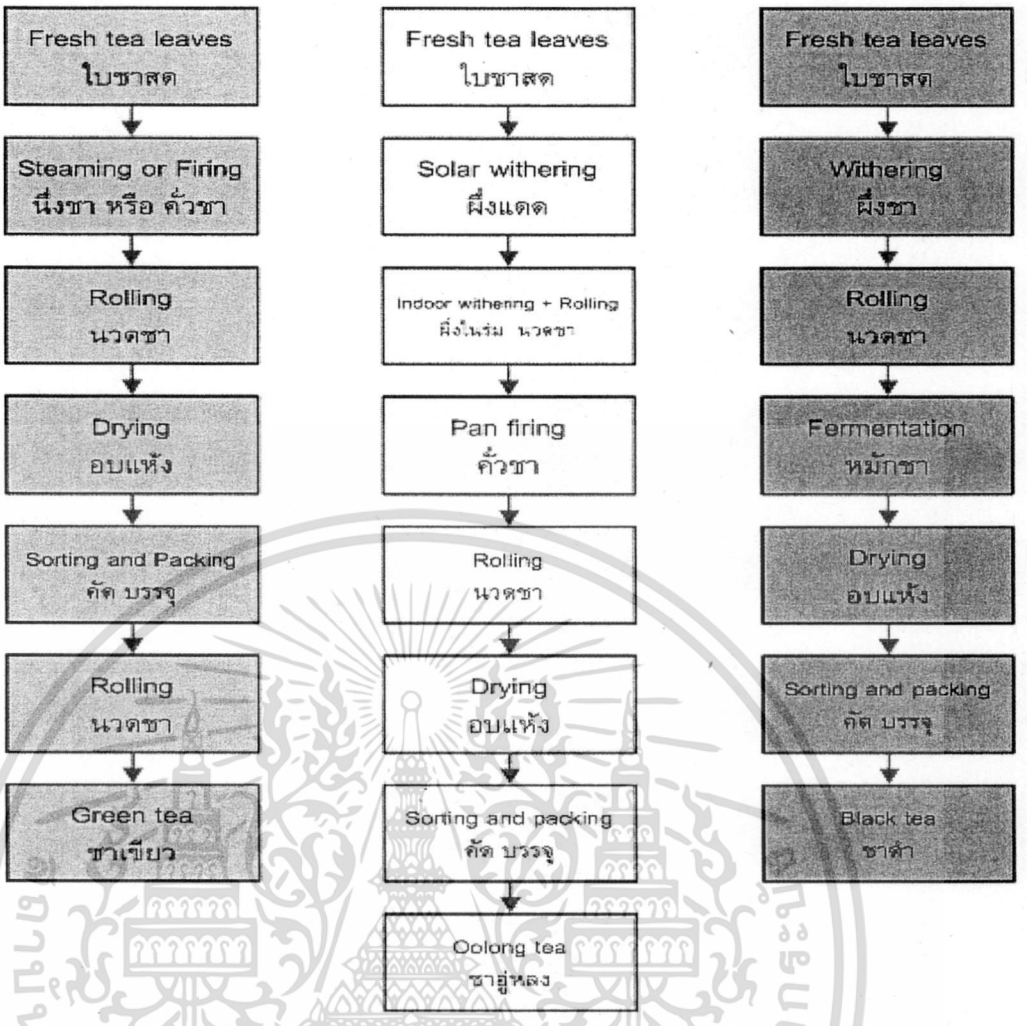
2.6.2 ชาอู่หลง

เป็นชาที่ผ่านกระบวนการหมักเพียงบางส่วน (Semi-fermented tea) ก่อนหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วยความร้อน จึงทำให้เกิดสารสำคัญที่เรียกว่า Oolong Tea polymerized-polyphenols หรือ OTPPs กรรมวิธีการผลิตจะมีการผึ่งแดด (withering) ประมาณ 20-40 นาที การผึ่งแดดเป็นกระบวนการหมักทำให้เอนไซม์ polyphenol oxidase และความร้อนจากกระบวนการผลิตเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาoxidationซึ่งทำให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของ polyphenols สารประกอบที่เกิดขึ้นนี้เป็นสาเหตุทำให้ชาอู่หลงมีกลิ่นและสีที่แตกต่างไปจากชาเขียว น้ำชาอู่หลงจะมีสีเหลืองอมเขียว และสีน้ำตาลอมเขียวตัวอย่างของสารในกลุ่มนี้ได้แก่ Oolonghomobisflavan A และ Oolonghomobisflavan B สารกลุ่มทีเอฟลาวิน (Theaflavins) และทีอะรูบิจิน (Thearubigins) โดยปริมาณของสารที่ได้จะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับระดับของการหมัก ส่วนใหญ่จะพบอยู่ในช่วงประมาณร้อยละ8.0-8.5 (http://teainstitutemfu.com/main/blog/, 25 มกราคม 2558)

2.6.3 ชาดำ

เมื่อเก็บใบชาอ่อนมาได้ นำไปบดด้วยลูกกลิ้ง เซลล์ใบชาจะแตกช้ำ และเอนไซม์ในเซลล์จะย่อยสลายสาร เกิดเป็นกระบวนการหมัก ทำให้เกิดกลิ่นและรส และใบชาเริ่มเปลี่ยนสีเป็นสีทองแดง ทิ้งไว้ระยะหนึ่งก่อนใช้ความร้อนเป่าไปที่ใบชาหรืออาจจะนำใบชาไปอังไฟ หรือรมด้วยไอน้ำ เอนไซม์จะหมดฤทธิ์ ใบชาเริ่มเปลี่ยนเป็นสีดำ นำไปตากหรืออบให้แห้ง ดังนั้นชาดำถือเป็น fermented tea และจากกระบวนการผลิตที่ผ่านการหมักจึงทำให้สารที่มีประโยชน์มีปริมาณลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับชาเขียวที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก เมื่อนำชาเขียวและชาดำปริมาณ100 กรัม มาทำการวิเคราะห์พบว่ามีสารคาเทชินเหลืออยู่ 14.2 และ 4 กรัม โดยชาเขียวมีปริมาณสารที่มากกว่า แต่พบว่าทั้งชาเขียวและชาดำต่างก็มีปริมาณของสารโพลีฟีนอลที่ใกล้เคียงกัน คือในใบชา 100 กรัม จะมีโพลีฟีนอล 15-16 กรัม กระบวนการผลิตชาชนิดต่างๆ แสดงดังรูปที่ 2.5 (http://teainstitutemfu.com/main/blog/, 25 มกราคม 2558)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.5 แสดงกระบวนการผลิตชาเขียว ชาอู่หลง และชาดำ

ที่มา : http://teainstitutemfu.com/main/blog/กระบวนการผลิตชา (21 มกราคม 2558)

2.7 การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

สารต่อต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์จะชะลอการเจริญเติบโตหรือทำลายจุลินทรีย์ จึงช่วยลดการเน่าเสียของอาหารที่เกิดจากจุลินทรีย์ กลไกในการทำงานของสารต่อต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ ประกอบด้วยการทำให้สมบัติของผนังเซลล์ของจุลินทรีย์เปลี่ยนไปทำให้จุลินทรีย์ชะงักการเจริญเติบโตและตายในที่สุด การทำให้ประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์เสียไป จุลินทรีย์จึงไม่เจริญและตายได้ การมีผลต่อกลไกทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์ ทำให้จุลินทรีย์หยุดชะงักการแบ่งเซลล์ จุลินทรีย์จึงไม่เพิ่มปริมาณและจุลินทรีย์ที่มีอยู่จะตาย จึงมีจำนวนจุลินทรีย์ลดลง ประสิทธิภาพของสารต่อต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้เติมลงในอาหารโดยทั่วไปถ้าใช้ปริมาณมากขึ้นประสิทธิภาพก็จะมากขึ้น ปกติจะใช้ในปริมาณที่เพียงพอแก่การชะลอการเจริญของจุลินทรีย์ จุลินทรีย์ชนิดต่างกันจะตอบสนองต่อสารแต่ละชนิดแตกต่างกัน อุณหภูมิของอาหาร สารที่มีฤทธิ์เป็นกรดเพราะสารที่ใช้บางชนิดสลายตัวที่อุณหภูมิสูง และสมบัติทางเคมีและกายภาพของอาหารมีผลต่อประสิทธิภาพของสารต่อต้านการเจริญของจุลินทรีย์ เช่น อาหารที่มีฤทธิ์เป็นกรดจะทำให้สารเคมีบางชนิดเช่น กรดเบนโซอิคมีประสิทธิภาพสูงขึ้น (http://coursewares.mju.ac.th:81/e-learning50/FT320/082.htm, 24 มกราคม 2558)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7.1 การใช้สารปฏิชีวนะ (antibiotics) (บัญญัติ, 2521)

สารปฏิชีวนะหรือยาปฏิชีวนะสามารถฆ่าหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ ยาปฏิชีวนะแต่ละชนิด จะมีฤทธิ์ต่อจุลินทรีย์เพียงบางชนิดเท่านั้น แต่ยาปฏิชีวนะบางชนิด จะออกฤทธิ์ต่อจุลินทรีย์หลายชนิด เรียกว่าเป็น broad spectrum antibiotics นอกจากนี้ยังขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์ด้วย ปัจจุบันมีการใช้ยาปฏิชีวนะกันอย่างแพร่หลายทำให้เชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดมีการดื้อยาปฏิชีวนะมากขึ้น

การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาทำได้หลายวิธีที่นิยมทำมากที่สุด คือวิธี disc agar diffusion method เพราะว่าสะดวก ประหยัดและใช้เวลาน้อยกว่าวิธีอื่น วิธีทำโดยเทียบเชื้อที่ต้องการจะทดสอบให้มีความขุ่นเท่ากับMcFarland Number 0.5 (เท่ากับจำนวนเชื้อแบคทีเรียประมาณ 1.5 x10^8 เซลล์/มล.) แล้วใช้ sterile swab ป้ายเชื้อแบคทีเรียให้ทั่วจานเพาะเชื้อปล่อยทิ้งไว้ 3 – 5 นาที แล้วจึงวางกระดาษตาปลา (filter paper disc) ซึ่งชุบยาปฏิชีวนะชนิดต่างๆ ในความเข้มข้นที่แน่นอน ลงบนผิวอาหารที่เพาะเชื้อไว้แล้ว จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16 - 18 ชั่วโมง ถ้าเชื้อนั้นถูกทำลาย หรือถูกยับยั้งด้วยยาปฏิชีวนะชนิดใด ก็จะเห็นบริเวณใสๆ หรือ clear zone การไม่มีเชื้อเจริญขึ้นรอบๆ กระดาษตาปลา เรียกบริเวณใสๆนี้ว่า inhibition zone เส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone จะแคบหรือกว้าง แตกต่างตามชนิดของยา และความไวหรือดื้อยาของเชื้อต่อยานั้น

ยาปฏิชีวนะโดยทั่วไปหมายถึงสารเคมีที่ผลิตโดยจุลินทรีย์บางชนิด และสามารถฆ่าหรือยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์สาเหตุของโรค หรือจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ หรืออาจเป็นสารเคมีซึ่งได้มาจากการสังเคราะห์ทางเคมี แต่ต้องอาศัยโครงสร้างของสารเคมีที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นเป็นแกนกลางในการสังเคราะห์เพื่อเพิ่มโครงสร้างของโมเลกุลใหม่ โดยมีวัตถุประสงค์ที่จะทำให้สารนั้นมีคุณสมบัติดีขึ้นทั้งในการฆ่าหรือยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และคุณสมบัติอื่นๆ ของสารเอง จุลินทรีย์บางชนิด เช่น เชื้อรา *Pencilliumchrysogenum* สามารถสร้างสารเพนนิซิลิน แบคทีเรีย *Streptomyces griseus* สามารถสร้างสารสเตรปโตมัยซิน

2.7.2 กลไกการออกฤทธิ์ของสารต้านจุลินทรีย์และการทำลายจุลินทรีย์

กระบวนการที่จุลินทรีย์ถูกยับยั้งหรือทำลายได้เนื่องจากปัจจัยต่างๆ นั้น มีสาเหตุมาจากการทำลายที่ส่วนต่างๆของเซลล์ของจุลินทรีย์ดังนี้

1. การทำลายที่ผนังเซลล์ หรือการยับยั้งการสร้างผนังเซลล์

พบว่าผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิดถูกทำลายได้ด้วยเอนไซม์ไลโซไซม์ (lysozyme) ที่พบในน้ำตา เม็ดเลือดขาว เมือก เป็นต้น และยังพบในแบคทีเรียอีกหลายชนิด เอนไซม์นี้จะไปย่อยสลายโครงสร้างของผนังเซลล์ทำให้เซลล์แตก

สารเคมีบางชนิดอาจไปยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียที่กำลังเจริญเติบโต มีผลทำให้เกิดเป็นโฟรโทพลาสต์ (photoplast) ซึ่งถ้าไม่เลี้ยงไว้ในสภาพที่เหมาะสม เซลล์จะแตกได้ หรือการให้ยาเพนิซิลลินก็มีผลยับยั้งการสร้างผนังเซลล์

2. เกิดการเปลี่ยนแปลงสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์ที่ยอมให้สารผ่าน (cell permeability)

เยื่อหุ้มเซลล์มีสมบัติยอมให้สารอาหารผ่านเข้าสู่เซลล์ ถ้าเยื่อหุ้มเซลล์นี้ถูกทำลายจะมีผลทำให้เซลล์ชะงักการเจริญเติบโต และทำให้เซลล์ตายได้ สารเคมีบางอย่าง เช่น ฟีนอล สารซักฟอก สบู่ มีความสามารถที่ไปเปลี่ยนแปลงสมบัตินี้ของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้องค์ประกอบต่างๆ ภายในเซลล์รั่วไหลออกมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพของโปรตีนและกรดนิวคลีอิก

เซลล์ที่มีชีวิตต้องมีโปรตีน และกรดนิวคลีอิกอยู่ภายในเซลล์ในสภาพปกติหรือเป็นธรรมชาติ ถ้ามีสารเคมีหรือสภาพใดๆที่มาทำให้โปรตีนและกรดนิวคลีอิกเปลี่ยนไปจากสภาพธรรมชาติ (denature) จะมีผลทำลายเซลล์ได้ เช่น อุณหภูมิสูง สารเคมีความเข้มข้นสูงจะทำให้โปรตีนและกรดนิวคลีอิกตกตะกอน จับตัวเป็นก้อนแข็ง ซึ่งจะไม่สามารถแปรสภาพกลับเหมือนเดิมได้อีก

4. การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

เอนไซม์ต่างๆจำเป็นในปฏิกิริยาเคมีของกระบวนการเมแทบอลิซึมในเซลล์ ดังนั้นถ้ามีตัวยังยั้งเอนไซม์ (enzyme inhibitor) ก็จะมีผลต่อปฏิกิริยาของกระบวนการต่างๆ เช่น กระบวนการไกลโคลิซิส (glycolysis) วัฏจักรเครปส์ (Kreb's cycle ortricarboxylic acid cycle) และระบบไซโตโครม (cytochrome system) สารที่เป็นตัวยังยั้ง ได้แก่ ไซยาไนด์ ยังยั้งไซโตโครมออกซิเดส ฟลูออไรด์ยับยั้งไกลโคลิซิส เป็นต้น

สารที่เป็นออกซิไดซิงเอเจนต์อย่างแรง เช่น ฮาโลเจน และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ อาจทำลายองค์ประกอบของเซลล์จนเซลล์ไม่สามารถทำหน้าที่ตามปกติต่อไปได้ เช่น รวมตัวกับหมู่ซัลฟ์ไฮดริล(sulfhydryl) ของเอนไซม์ในเซลล์ ทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนไป เอนไซม์จึงไม่ทำงาน นอกจากนี้ยังมีไอออนของโลหะ เช่น เงิน ทองแดง และปรอท ซึ่งจะไปรวมตัวกับหมู่ซัลฟ์ไฮดริลของเอนไซม์หรือโปรตีน มีผลทำให้เซลล์ถูกทำลายได้

5. ป้องกันการสร้างเมแทบอไลต์ (antimetabolites)

เมแทบอไลต์เป็นสารที่จำเป็นสำหรับกระบวนการเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ เช่น ในการสังเคราะห์กรดโฟลิก จุลินทรีย์จำเป็นต้องใช้สารกรดพาราอะมิโนเบนโซอิก (p-aminobenzoic acid) ซึ่งสารนี้มีโครงสร้างคล้ายกับ ซัลฟานิลาไมด์ (sulfanilamide) ดังนั้นการใช้ซัลฟานิลาไมด์เข้าแย่งทำปฏิกิริยาแทนที่กรดพาราอะมิโนเบนโซอิก ทำให้การสังเคราะห์กรดโฟลิกหยุดชะงัก ดังนั้นการใช้สารเคมีที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกันกับสารเมแทบอไลต์เพื่อไปยับยั้งเมแทบอลิซึมของเซลล์จึงช่วยทำลายจุลินทรีย์ได้

6.การยับยั้งการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก

สารบางอย่างมีผลในการยังยั้งการสังเคราะห์ DNA และ RNA โดยสารนั้นจะไปขัดขวางการสร้างหน่วยพื้นฐานของกรดนิวคลีอิก คือ พิวรีนและพิริมิดีน และไปขัดขวางการรวมตัวของนิวคลีโอไทด์เข้าเป็นกรดนิวคลีอิก ซึ่งมีผลต่อการสังเคราะห์โปรตีนของเซลล์ทำให้กระบวนการเมแทบอลิซึมผิดปกติไป และทำให้เซลล์ถูกทำลายได้ในที่สุด (http://www.thaieditorial.com/กลไกการออกฤทธิ์ของสาร, 24 มกราคม 2558)

2.8 การศึกษาผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อโดยวิธี Agar diffusion (บงกชวรรณและบรรยง, 2554)

วิธี Agar diffusion เป็นการทดสอบความไวของสารต้านจุลินทรีย์ โดยทำการนำจุลินทรีย์ที่เลี้ยงให้เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อมาทำการมาปรับความขุ่นใน Normal saline solution ให้ขุ่นเท่ากับ McFarland standard nephelometer No.0.5 จากนั้นใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อจุ่มเชื้อที่ปรับความขุ่น ป้ายให้ทั่วผิวหน้า จานเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton agar plate (MHA) จากนั้นทำการเจาะหลุมผิวหน้าอาหาร และหยดสารที่ต้องการทดสอบลงไป ทำการบ่ม และปล่อยให้เชื้อมีการเจริญเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ระยะเวลา 18 -24 ชั่วโมง จากนั้นนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อมาทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของการยับยั้ง (Zone of inhibition) โดยจะเห็นเป็นวงใสรอบๆหลุม

2.9 ประโยชน์ของคอมบูชา

คอมบูชาเป็นเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพที่มีรสหวานอมเปรี้ยว เกิดจากกระบวนการหมักของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์กลุ่มโพรไบโอติก ส่วนประกอบหลักได้แก่ กรดอะซิติก กรดแลคติก กรดกลูโคนิก กรดกลูโคโรนิก และยังมีสาร D-saccharic acid-1, 4-lactone (DSL)เป็นสารที่ช่วยส่งเสริมให้ตับขับสารพิษ และสารก่อมะเร็งได้ดีขึ้น คอมบูชามีสารต้านอนุมูลอิสระหลายชนิด เช่น โพลีฟีนอล รวมทั้งทีเฟลวิน และทีรูบิกิน ซึ่งพบในปริมาณสูงในชาดำ ปริมาณโพลีฟีนอลที่สูง ทำให้การต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น ช่วยป้องกันร่างกายจากการทำลายของอนุมูลอิสระได้ดีขึ้น นอกจากนี้ยังพบสารต้านจุลินทรีย์ที่ก่อโรค และสารต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งบางชนิด (สายสมร, 2557)

ปกติสารพิษที่เข้าสู่ร่างกายจะเข้าสู่ตับ และถูกกำจัดออกนอกร่างกายด้วยกระบวนการที่เรียกว่า กลูคูโรนิเดชัน (Glucuronidation) โดยสารพิษจะรวมตัวกับกรดกลูคูโรนิก เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกลูคูโรไนด์ (Glucoronide complex) สารประกอบที่เกิดขึ้นมีความเป็นพิษน้อย หรือหมดความเป็นพิษ ซึ่งผ่านออกจากตับทางท่อน้ำดี เข้าสู่ลำไส้ใหญ่ และกำจัดทิ้งทางอุจจาระ ขณะที่สารกลูคูโรไนด์อยู่ในลำไส้ใหญ่เพื่อรอการกำจัดทิ้งจะถูกเอนไซม์เบต้ากลูคูโรนิเดส(β-glucuronidase) ซึ่งสังเคราะห์จาก *Escherichia coli*ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่ ปล่อยสารพิษออกมาและดูดซึมเข้าสู่ร่างกาย ในคนที่มีการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้สูงมีโอกาสเป็นโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่สูงกว่าคนทั่วไป เนื่องจากสารก่อมะเร็งที่ถูกกำจัดทิ้งโดยกระบวนการกลูคูโรนิเดชันจะถูกปลดปล่อยโดยเอนไซม์ชนิดนี้ และดูดซึมเข้าสู่ลำไส้ใหญ่ สำหรับสาร DSL ก็เช่นเดียวกันกับกรดกลูคูโรนิก สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นี้ จึงช่วยส่งเสริมการกำจัดสารก่อมะเร็ง และสารพิษอื่นๆ ออกจากร่างกาย ดังนั้นการที่ร่างกายได้รับอาหารหรือเครื่องดื่มที่มีกรดกลูคูโรนิก และสารDSL จึงช่วยส่งเสริมการทำงานของตับในการกำจัดสารก่อมะเร็ง และสารพิษต่างๆ ออกจากร่างกาย (พาณี และคณะ, 2556)

นอกจากนี้คอมบูชายังเป็นเครื่องดื่มที่ให้ความสดชื่น และช่วยฟื้นฟูร่างกาย แพทย์ทางเลือกทั้งในประเทศจีน และยุโรปตะวันออกใช้ฟื้นฟูสภาพร่างกายของผู้ป่วยจากโรคต่างๆ ช่วยระบบขับถ่าย บรรเทาอาการอ่อนเพลีย ช่วยการนอนหลับ ลดคอเลสเตอรอล ลดความดันโลหิต ลดการอักเสบ ไมเกรน เป็นต้น (ฉัตรชัย, 2557)

2.9.1 ประโยชน์ของกรดอินทรีย์ที่พบในคอมบูชา

2.9.1.1 กรดอะซีติก (Acetic Acid) ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคหลายชนิดและถนอมอาหาร

2.9.1.2 กรดมาลิก (Malic Acid) ช่วยในกระบวนการล้างพิษ

2.9.1.3 กรดกลูโคนิก (Gluconic Acid) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

2.9.1.4 กรดนิวคลีอิก (Nucleic Acid) ซ่อมแซมฟื้นฟูเซลล์

2.9.1.5 กรดโฟลิก (Folic Acid) สร้างเม็ดเลือดแดง และควบคุมการทำงานของสมอง

2.9.1.6 กรดแลคติก (Lactic Acid) ช่วยในการย่อยอาหารและถนอมอาหาร

2.9.1.7 กรดออกซาลิก (Oxalic Acid) ส่งเสริมการผลิตพลังงานของเซลล์ และถนอมอาหาร

2.9.1.8 กรดบิวทิริก (Butyric Acid) ลดอาการอักเสบ

2.9.1.9 กรดอะมิโน (Amino Acids) ซ่อมแซมเนื้อเยื่อ และเสริมสร้างภูมิคุ้มกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

146125

2.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.10.1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของคอมบูชา

Steinkraus และคณะ (1996) ได้รายงานถึงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์จากน้ำหมักคอมบูชาที่ต่อต้านเชื้อ *Helicobacter pylori, E. coli, Staphylococcus aureus* และ *Agrobacterium tumefaciens* ส่วนใหญ่จะเกี่ยวข้องกับกรดอะซิติกที่ผลิตในระหว่างกระบวนการหมัก

Greenwalt และคณะ (1997) ได้ศึกษาสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของชาหมักคอมบูชา ในการศึกษานี้จะมุ่งเน้นการศึกษาการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยวิธี Absorbent disc method ในชาหมักที่มีปริมาณกรดทั้งหมด 33 กรัมต่อลิตร (มีกรดอะซิติก7 กรัมต่อลิตร) สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบได้ เช่น *Agrobacterium tumefaciens, Bacillus cereus, Salmonella typhimurium, Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli*

Sreeramulu และคณะ (2000) แสดงให้เห็นว่าคอมบูชาที่หมักจากชาดำเป็นเวลา 14 วันมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ*Candida albicans* ได้ในวันที่ 6 ของการหมัก

Sreeramulu และคณะ (2000) ศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของคอมบูชา พบว่า พีเอชของคอมบูชาลดลงอย่างต่อเนื่องจาก 5 ถึง 2.5 ในหว่างการหมักน้ำหมักของชาเห็ด(tea fungus)และค่าการดูดกลืนแสง (OD) เพิ่มขึ้นจนถึงวันที่สี่ หลังจากนั้นคงที่ปริมาณกรดอะซิติกที่ผลิตโดยแบคทีเรียและยีสต์เพิ่มขึ้นจนถึงวันที่สี่หลังจากนั้นจะลดลง ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของคอมบูชาถูกนำมาทดสอบกับจุลินทรีย์ที่ก่อโรค *Staphylococcus aureus, Shigellasonnei, E. coli, Aeromonashydrophila, Yersinia enterolitica, Pseudomonas aeruginosa, Enterobacter cloacae, Staphylococcus epidermis, Campylobacter jejuni, Salmonella enteritidis, Salmonella typhimurium, Bacillus cereus, Helicobacter pylori* และ*Listeria monocytogenes* พบว่าจุลินทรีย์เหล่านี้มีความไวต่อน้ำหมักคอมบูชา การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า มีสารประกอบอื่นๆที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์มากกว่ากรดอะซิติกและโปรตีนขนาดใหญ่ในคอมบูชา

Battikh และคณะ (2013) ศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของคอมบูชาระหว่างการหมักชาเขียวและชาดำเป็นเวลา 21 วัน และศึกษาสารประกอบที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและรา ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในคน ทดสอบโดยใช้วิธี agar diffusion พบว่า การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำหมักคอมบูชามีประสิทธิภาพกับจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบ ยกเว้น *Candida krusei* ชาเขียวมีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ โดยแสดงบริเวณที่ถูกยับยั้งขนาดใหญ่ของ *Staphylococcus epidermidis* (22 มิลลิเมตร) *Listeria monocytogenes* (22 มิลลิเมตร) และ *Micrococcus luteus* (21.5 มิลลิเมตร) ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *Candida* เห็นได้ชัดใน *Candida parapsilosis*

2.10.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องของการหมักคอมบูชา

Teohและคณะ (2004) คอมบูชาเป็นเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพที่บริโภคกันมาตั้งแต่หลายพันปีของประเทศตะวันออก และแพร่หลายในประเทศตะวันตก ปัจจุบันคอมบูชาได้รับความสนใจเพิ่มขึ้นในด้านผลิตภัณฑ์ที่ช่วยในการลดน้ำหนัก ตลอดจนการรักษาโรคมะเร็ง และเอดส์ แบคทีเรียที่มีบทบาทในการหมักคอมบูชา เช่น *Acetobacter* spp. โดยเฉพาะอย่างยิ่งสายพันธุ์ที่ผลิตเซลลูโลสของ *Acetobacterxylinum* และอาจจะพบ *Gluconobacter* spp. และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lactobacillus spp. นอกจากนี้ยังพบยีสต์ เช่น *Candida, Kloeckera, Pichia, Saccharomyces, Saccharomycoides, Shizosaccharomyces, Torulospora* และ *Zygosaccharomyces*

Chen และ Liu (2000) ศึกษาการเตรียมชาเห็ด โดยมีขั้นตอนดังนี้ ต้มน้ำกลั่น 1 ลิตร เติมซูโครส 100กรัม และชา 2 ซอง(ชาลิปตัน) จากนั้นทำการคนให้เข้ากัน ต้มเป็นเวลา 5นาที หลังจากนั้นนำถุงชาออก จะได้ชาดำที่มีรสหวาน จากนั้นนำมาใส่ในโหลแก้วขนาด 500 มิลลิลิตร (เติมชาที่ได้ลงไป 250มิลลิลิตร) ทิ้งให้เย็น ขั้นตอนสุดท้ายเป็นการเติมแผ่นเซลลูโลส (ร้อยละ 2.5 น้ำหนักต่อปริมาตรของน้ำหนักเปียก) และน้ำหมัก (ร้อยละ20 ปริมาตรต่อปริมาตร)จากนั้นปิดปากโหลแก้วด้วยผ้าขาวบางที่สะอาด ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 24 ±3 °C เป็นเวลา 2 สัปดาห์ น้ำหมักที่ได้บางส่วนสามารถนำไปเป็นหัวเชื้อในการหมักครั้งต่อไป

Malbaša และคณะ (2008) พบว่าคอมบูชา เป็นเครื่องดื่มที่มีรสเปรี้ยว เป็นผลผลิตที่เกิดจากการหมักของชาดำ สารที่ได้จากการหมักของคอมบูชา ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว กรดอินทรีย์หลายชนิด และวิตามิน นอกจากนี้ยังมีสารอื่นๆที่เป็นผลมาจากการเกิดปฏิกิริยาโดยเฉพาะอย่างยิ่ง กรดอินทรีย์ ที่เป็นองค์ประกอบในการหมักชาซึ่งมีทั้งประโยชน์และผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 เชื้อจุลินทรีย์

3.1.1.1 เชื้อ *Escherichia coli*TISTR887

3.1.1.2 เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*TISTR781

3.1.1.3 เชื้อ *Vibrio parahaemolyticus*TISTR1596

3.1.1.4 เชื้อ *Salmonella typhimurium*TISTR5562

3.1.1.5 เชื้อ *Bacillus cereus*TISTR5040

3.1.1.6 เชื้อ *Staphylococcus aureus*TISTR118

3.1.1.7 เชื้อ *Listeria monocytogenes*

เชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

3.1.2 วัตถุดิบ

3.1.2.1 ชาดำ (ตราอี้เหวิน)

3.1.2.2 ชาอู่หลง (ตราจินเซียนอูหลง)

3.1.2.3 ชาเขียว (ตราจินหลง)

3.1.2.4 น้ำตาลซูโครส (น้ำตาลทราย ตราวังขนาย)

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

3.1.3.1 อาหารสูตร Mueller Hinton Broth (MHB)

3.1.3.2 อาหารสูตร Mueller HintonAgar (MHA)

3.1.4 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.1.4.1 ซูโครสมาตรฐาน

3.1.4.2 ไฮโดรคลอริก

3.1.4.3 โซเดียมไฮดรอกไซด์

3.1.4.4 ฟีนอล์ฟทาลีน

3.1.4.5 น้ำกลั่น

3.1.4.6 3,5ไดไนโตรซาลิไซลิก

3.1.4.7 โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทต

3.1.4.8 เอทานอลร้อยละ 90

3.1.5 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.1.5.1 โหลแก้วขนาด 850 มิลลิลิตร

3.1.5.2 ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

3.1.5.3 จานเพาะเชื้อ

3.1.5.4 ตะเกียงแอลกอฮอล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.5.5 Cork borerขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร

3.1.5.6 ลวดเขี่ยเชื้อ

3.1.5.7 ปิเปต

3.1.5.8 บิวเรตต์

3.1.5.9 เครื่องชั่งน้ำหนักสี่ตำแหน่งยี่ห้อ Sartorius รุ่น TE214S

3.1.5.10 เครื่องมือวัดขนาด (Vernier calipers) ยี่ห้อMitutoyo รุ่น Absolute Digital Caliper

3.1.5.11 ตู้เขี่ยเชื้อยี่ห้อ Telstarรุ่น Bio II Advance 4

3.1.5.12 ตู้บ่มเชื้อ ยี่ห้อ Memmertรุ่นINB 500

3.1.5.13 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง ยี่ห้อ Cleanรุ่น PH200 & PH500

3.1.5.14 หม้อนึ่งอัดไอยี่ห้อ Tomyรุ่นES-315

3.1.5.15 เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น GC-2014

3.1.5.16 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ยี่ห้อShimadzu รุ่น UV-1601

3.2 ขั้นตอนในการดำเนินงาน

การดำเนินงานแบ่งเป็นขั้นตอนดังนี้

3.2.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักคอมบูชา โดยศึกษาชนิดของชาและความเข้มข้น ของน้ำตาลซูโครส

3.2.1.1 การเตรียมหัวเชื้อ

นำน้ำสะอาดปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ต้มให้เดือด จากนั้นนำชาดำที่ห่อด้วยผ้าขาวบาง 4 กรัม ใส่ลงในน้ำที่ต้มจนเดือดเป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำชาออกจากน้ำชา และเติมน้ำตาลซูโครส 70 กรัม (ร้อยละ 7 น้ำหนักต่อปริมาตร) คนให้น้ำตาลซูโครสละลาย ทิ้งไว้ให้เย็น เทน้ำหมักใส่ในขวดโหลที่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยเติมน้ำชาปริมาตร 1000 มิลลิลิตร จากนั้นเติมแผ่นเซลลูโลสเก่าลงในน้ำชาร้อยละ 3ของน้ำหนักเปียก (30 กรัม) และเติมส่วนที่เป็นน้ำหมักเดิมร้อยละ 10ปริมาตรต่อปริมาตร (100 มิลลิลิตร) ปิดปากโหลด้วยผ้าขาวบาง รัดให้แน่น บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10-12 วัน

3.2.1.2 ศึกษาชนิดของชาและความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นในการหมักคอมบูชา

ศึกษาชนิดของชา และความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นที่เหมาะสมโดยกระบวนการหมักมีขั้นตอนเหมือนการเตรียมหัวเชื้อที่ได้กล่าวในข้างต้น โดยใช้ชา 3 ชนิดในการหมัก คือชาดำ ชาเขียว และชาอู่หลง ศึกษาความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลซูโครส ใช้ความเข้มข้นร้อยละ 10 15และ20ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ หมักเป็นเวลา 10 วัน เก็บตัวอย่างในวันที่ 0 2 4 6 8 และ10 วิเคราะห์ค่าพีเอชของน้ำหมัก ปริมาณกรดทั้งหมด(ในรูปกรดอะซิติก) ปริมาณซูโครสโดยดัดแปลงวิธี DNS methodผลผลิตเซลลูโลส และปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้โดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ(GC)

3.2.1.3 การวิเคราะห์

นำน้ำหมักที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสมาวิเคราะห์ค่าต่างๆ ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. พีเอช(pH)

วิเคราะห์โดยเครื่อง pH meter รุ่น Clean : pH200&pH500

2. ปริมาณกรดทั้งหมด (ในรูปกรดอะซิติก)

วิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมด (ในรูปกรดอะซิติก) โดยนำน้ำหมักที่ได้ 10 มิลลิลิตร มาทำการเจือจางกับน้ำปลอดคาร์บอนไดออกไซด์ปริมาตร 90 มิลลิลิตร หยดสารละลายฟีนอฟทาลีน 2-3 หยด นำมาไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล บันทึกปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ทำให้สารละลายตัวอย่างเปลี่ยนเป็นสีชมพู (จุดสมดุล)ตามสูตรดังนี้

$$\text{ร้อยละกรดอะซิติก} = \frac{\text{ปริมาณของสารละลาย NaOH (ml)} \times \text{ความเข้มข้นของสารละลาย NaOH} \times \text{Mw (acetic acid = 60)} \times 100}{1000 \times \text{ปริมาตรของสารตัวอย่าง}}$$

3. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลซูโครสโดยดัดแปลงจากวิธีดีเอ็นเอส (DNS method)

นำน้ำหมักที่ได้ใส่ลงในหลอดทดลองปริมาตร 1 มิลลิลิตร หยดสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 1 หยด นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำมาหยดสารละลายเบสโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 3 หยด และเติมดีเอนเอสปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ทำให้เย็นทันที จากนั้นเติมน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ควรมีค่าอยู่ในช่วง 0.2-0.8 หากเกินจากนี้ควรทำการเจือจางน้ำหมักที่ได้ การคำนวณปริมาณน้ำตาลซูโครส หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ค) (ที่มา : http://www.eng.umd.edu)

4. การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล

นำตัวอย่างน้ำหมัก ที่หมักเป็นเวลา 10 วัน วิเคราะห์ปริมาณเอทานอล โดยผสมน้ำหมักที่จะใช้ในการทดสอบกับ n- propanol ในอัตราส่วน 1:1 เทียบกับ standard ethanol นำมาวิเคราะห์โดยใช้เครื่องGas chromatographyยี่ห้อ Shimadzu รุ่น GC-2014

5. การวิเคราะห์ผลผลิตเซลลูโลส (yield of cellulose)

นำแผ่นเซลลูโลสที่ได้จากการหมักในวันที่ 10 ล้างด้วยน้ำสะอาด จากนั้นนำไปอบที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน นำมาทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิกเคเตอร์ นาน 2-3 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักแห้งของเซลลูโลสที่ได้ ตามสูตรดังนี้

ผลผลิตเซลลูโลส (กรัม/ลิตร) =

$$\frac{(\text{น้ำหนักเซลลูโลส} + \text{น้ำหนักกระดาษกรอง}) - \text{น้ำหนักกระดาษกรอง}}{\text{ปริมาตรน้ำหนัก (มิลลิลิตร)}} \times 1000$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2 การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อโรคในทางเดินอาหาร

3.2.2.1 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ

เตรียมหัวเชื้อโดยการถ่ายเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ *V. parahaemolyticus, S. typhimurium, E.coli, P. aeruginosa, B. cereus*, *S. aureus* และ *L.monocytogenes*ลงในอาหาร Mueller Hinton Broth(MHB) และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียที่เจริญในอาหารMHB streakลงบนอาหารMueller Hinton Agar (MHA) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร MHAที่อยู่ในจานเพาะเชื้อ นำปลายลูปแตะเชื้อมาเพียงเล็กน้อยใส่ลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้นร้อย 0.9 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำมาปรับความขุ่นให้เท่ากับความขุ่นของ McFarland standard No. 0.5 ซึ่งจะได้เซลล์แขวนลอยที่มีความหนาแน่นประมาณ 1.5×10^8เซลล์ต่อมิลลิลิตร

3.2.2.2 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของน้ำหมักคอมบูชาโดยวิธี Agar diffusion

เตรียมอาหาร MHA ในจานเพาะเชื้อ ใช้ไม้พันสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วชุบเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียที่มีความหนาแน่นประมาณ 1.5×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทา (Swab) ให้ทั่วอาหาร MHA ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อในตู้ปลอดเชื้อ จากนั้นทำการเจาะหลุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิลิตร บนอาหาร MHA ด้วย cork borer ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จำนวน 6หลุม หยดตัวอย่างจำนวน 6 ตัวอย่าง คือ ยาปฏิชีวนะvancomycin(0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)ลงบนจานเพาะเชื้อของแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่*S.aureus*, *B. cereus* และ *L. monocytogenes* ยาปฏิชีวนะ Gentamicin(0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)ลงบนจานเพาะเชื้อของแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่*V. parahaemolyticus, S. typhimurium, E.coli*และ*P. aeruginosa* ชาที่ใช้ทดสอบนำไปกรองผ่านกระดาษกรองขนาดรูพรุน 0.22 ไมโครเมตร คือชาเขียวที่ไม่ผ่านการหมัก ชาดำที่ไม่ผ่านการหมัก ชาเขียว และชาดำมีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสร้อยละ 15 และ20 ชาดำและชาเขียวที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสร้อยละ 15 และ20 ที่ผ่านการให้ความร้อน (โดยการนำไปต้มที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา15 นาที) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดลองเชื้อละ 5 ซ้ำ จากนั้นทำการตรวจผลโดยดูจากเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่เชื้อไม่เจริญ (clear zone)โดยใช้เวอร์เนียคาลิปเปอร์ (Vernier Caliper)ในการวัดขนาด

3.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.4 วิธีการทดสอบฤทธิ์การกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH

วิเคราะห์ตามวิธีของ Fu และคณะ (2014) โดยนำชาหมักที่ไม่ทำการเจือจางและน้ำชาหมักที่ทำการเจือจาง (50 100 200 และ 300 เท่า) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย DPPH ที่ละลายใน Absolute ethanol ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 20 นาที และวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ด้วย 96-well microplate reader ทำการทดลอง 3 ซ้ำ สารมาตรฐานคือสารละลาย DPPH กับ ethanol การคำนวณฤทธิ์ในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน ตามสมการดังนี้

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

$A_{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH

$A_{extract}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH

3.3 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ในการทดลองวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, (CRD) มีจำนวน 3 ซ้ำ วิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (ANOVA) และวิเคราะห์ค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างชุดการทดลองที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) โดย Duncan's new multiple range test (DMRT) ใช้โปรแกรมสถิติในการวิเคราะห์ข้อมูล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 ผลการศึกษาชนิดของชาและความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นที่เหมาะสมในการหมักคอมบูชา

4.1.1 ค่าพีเอชของคอมบูชา

จากการนำชา 3 ชนิด คือชาดำ ชาเขียว และชาอู่หลง หมักคอมบูชาโดยชาแต่ละชนิดใช้ความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นที่แตกต่างกันดังนี้ ร้อยละ 10 15 และ 20 น้ำหนักโดยปริมาตร หมักเป็นเวลา 10 วัน เก็บตัวอย่างน้ำหมักทุก 2 วัน (0 2 4 6 8 และ10 วัน) วิเคราะห์ค่าพีเอช ปริมาณกรดอะซิติก ปริมาณน้ำตาลซูโครส และผลผลิตเซลลูโลส โดยผลผลิตเซลลูโลสวิเคราะห์ในวันสุดท้ายของการหมัก จากการทดลองพบว่าค่าพีเอชของคอมบูชาจะลดลงตลอดระยะเวลาการหมัก โดยเฉพาะในวันที่สองของการหมัก ค่าพีเอชจะลดลงอย่างรวดเร็ว หลังจากนั้นค่าพีเอชจะลดลงอย่างช้าๆ จนสิ้นสุดการหมัก โดยพบในชาทั้งสามชนิดและทุกความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่ใช้ วันที่ 10 ซึ่งเป็นวันสุดท้ายของการหมัก ค่าพีเอชของชาอู่หลงที่ความเข้มข้นซูโครสร้อยละ 10 15 และ 20 มีค่า 2.53 ± 0.07 2.49 ± 0.03 และ 2.48 ± 0.02 ตามลำดับ ค่าพีเอชของชาดำที่ความเข้มข้นซูโครสร้อยละ 10 15 และ 20 มีค่า 2.59 ± 0.02 2.54 ± 0.02 และ 2.46 ± 0.03 ตามลำดับ สำหรับชาเขียวที่ความเข้มข้นซูโครสร้อยละ 10 15 และ 20 มีค่าพีเอช 2.57 ± 0.02 2.49 ± 0.04 และ 2.43 ± 0.03 ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.1

4.1.2 ปริมาณน้ำตาลซูโครส

น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่นิยมใช้ในการหมักคอมบูชา เนื่องจากราคาถูก หาได้ง่าย ในการศึกษานี้ได้ศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสในการหมักคอมบูชาจากชาสามชนิด พบว่าระหว่างการหมักคอมบูชา ปริมาณน้ำตาลซูโครสจะลดลงตามระยะเวลาการหมัก เนื่องจากจุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตคอมบูชาใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญและผลิตแอลกอฮอล์ และกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ (Frank, 1995; Hobbs, 1995) ในวันสุดท้ายของการหมัก ชาอู่หลงที่มีน้ำตาลซูโครสร้อยละ 10 15 และ 20 (น้ำหนักโดยปริมาตร) มีปริมาณน้ำตาลซูโครสเหลือ 81.44 ± 10.28 128.67 ± 4.48 และ 172.22 ± 8.48 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ชาดำมีปริมาณน้ำตาลซูโครสเหลือ 83.11 ± 11.66 119.33 ± 7.84 และ 164.78 ± 5.48 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และชาเขียวมีปริมาณซูโครสเหลือ 78.22 ± 9.91 120.78 ± 11.02 และ 167.55 ± 8.55 กรัมต่อลิตร ตามลำดับแสดงดังตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.2

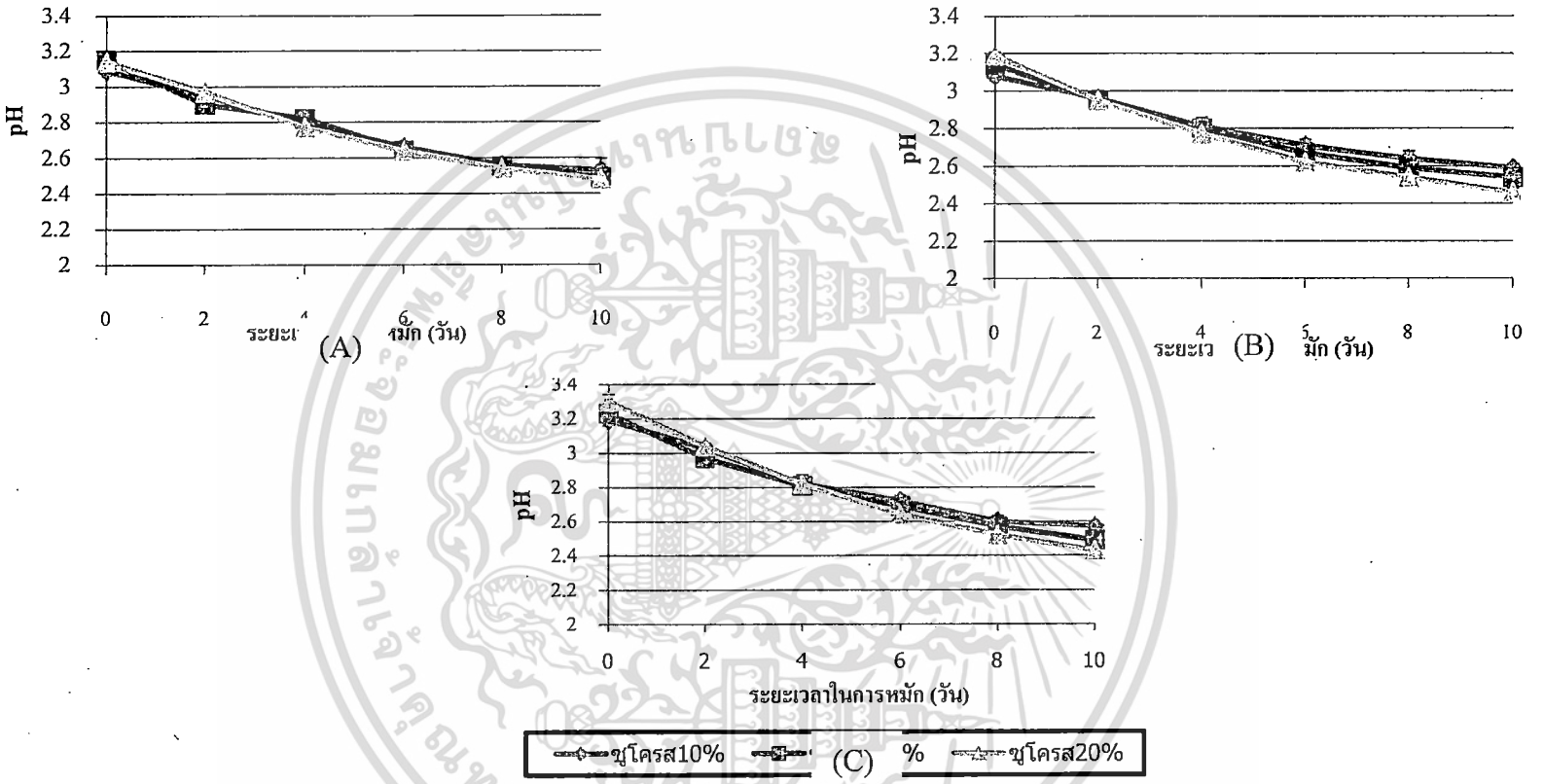
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ค่าพีเอชจากการหมักชาอู่หลง ชาดำ และชาเขียวที่มีความเข้มข้นซูโครสที่แตกต่างกัน ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	พีเอชของน้ำหมัก								
	ชาอู่หลง			ชาดำ			ชาเขียว		
	ซูโครส ร้อยละ10	ซูโครส ร้อยละ15	ซูโครส ร้อยละ20	ซูโครส ร้อยละ10	ซูโครส ร้อยละ15	ซูโครส ร้อยละ20	ซูโครส ร้อยละ10	ซูโครส ร้อยละ15	ซูโครส ร้อยละ20
0	$3.09^{a} \pm 0.02$	$3.15^{a} \pm 0.01$	$3.14^{a} \pm 0.03$	$3.08^{a} \pm 0.02$	$3.14^{a} \pm 0.02$	$3.19^{a} \pm 0.02$	$3.19^{a} \pm 0.03$	$3.23^{a} \pm 0.03$	$3.30^{a} \pm 0.04$
2	$2.95^{b} \pm 0.02$	$2.90^{b} \pm 0.02$	$2.97^{b} \pm 0.03$	$2.96^{b} \pm 0.04$	$2.95^{b} \pm 0.03$	$2.95^{b} \pm 0.02$	$3.03^{b} \pm 0.03$	$2.97^{b} \pm 0.02$	$3.04^{b} \pm 0.01$
4	$2.79^{c} \pm 0.01$	$2.82^{c} \pm 0.02$	$2.77^{c} \pm 0.04$	$2.81^{c} \pm 0.05$	$2.80^{c} \pm 0.04$	$2.77^{c} \pm 0.04$	$2.82^{c} \pm 0.05$	$2.81^{c} \pm 0.04$	$2.82^{c} \pm 0.02$
6	$2.66^{d} \pm 0.02$	$2.64^{d} \pm 0.01$	$2.64^{d} \pm 0.03$	$2.71^{d} \pm 0.03$	$2.67^{d} \pm 0.04$	$2.62^{d} \pm 0.04$	$2.72^{d} \pm 0.03$	$2.69^{d} \pm 0.04$	$2.64^{d} \pm 0.02$
8	$2.56^{e} \pm 0.01$	$2.55^{e} \pm 0.01$	$2.54^{e} \pm 0.03$	$2.64^{e} \pm 0.04$	$2.59^{e} \pm 0.04$	$2.54^{e} \pm 0.04$	$2.60^{e} \pm 0.03$	$2.57^{e} \pm 0.04$	$2.52^{e} \pm 0.03$
10	$2.53^{e} \pm 0.07$	$2.49^{f} \pm 0.03$	$2.48^{f} \pm 0.02$	$2.59^{e} \pm 0.02$	$2.54^{e} \pm 0.02$	$2.46^{f} \pm 0.03$	$2.57^{e} \pm 0.02$	$2.49^{f} \pm 0.04$	$2.43^{f} \pm 0.03$

หมายเหตุ

- ^{abc}ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
- ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ



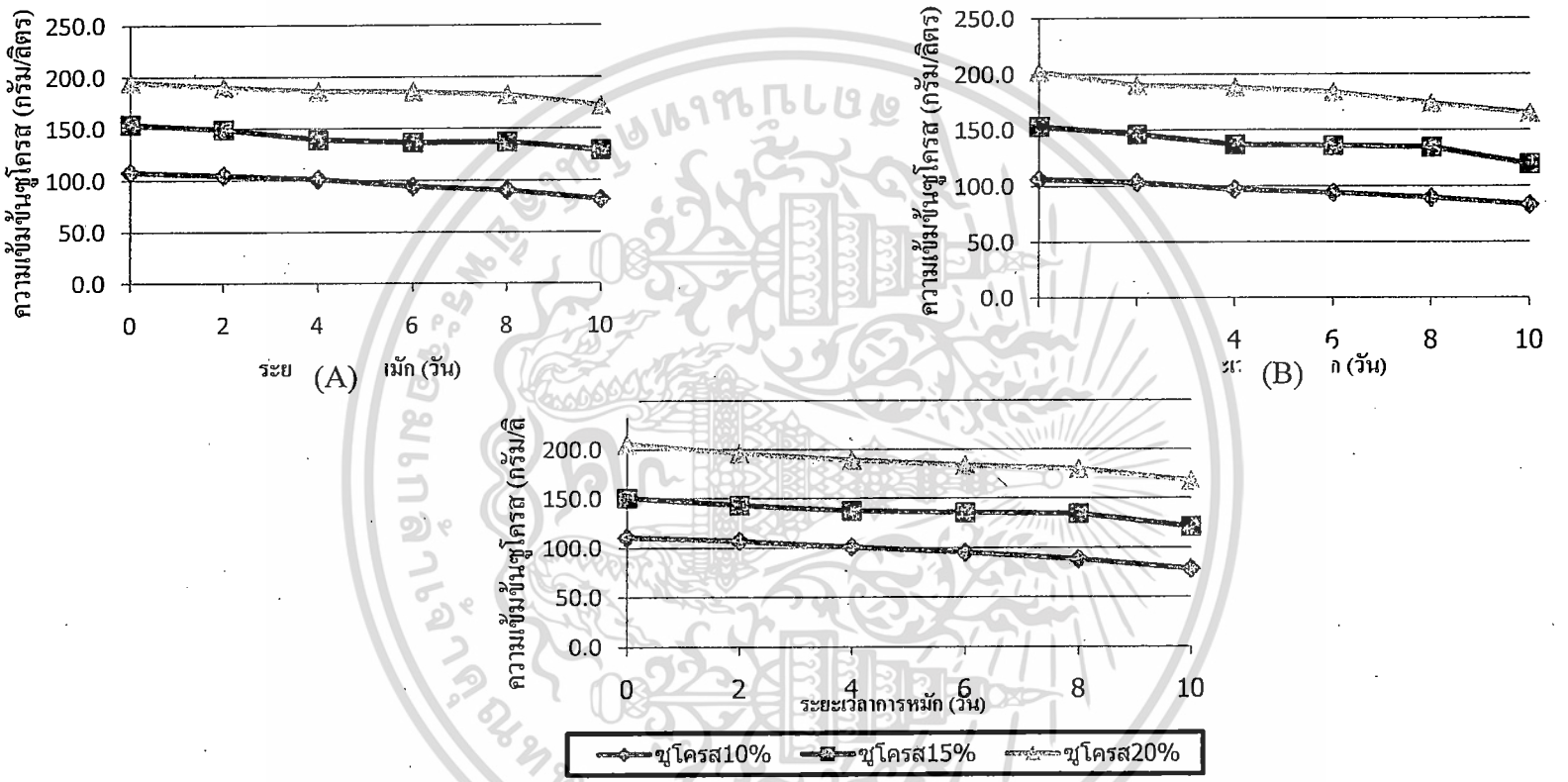
รูปที่ 4.1 ค่าพีเอชของการหมัก (A)ชาอู่หลง (B) ชาดำ และ (C) ชาเขียวที่มีความเข้มข้นซูโครสแตกต่างกัน หมักในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน

ตารางที่ 4.2 ปริมาณน้ำตาลซูโครสจากการหมักชา 3 ชนิด ที่มีความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นแตกต่าง หมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	ปริมาณน้ำตาลซูโครส (กรัมต่อลิตร)								
	ชาอู่หลง			ชาดำ			ชาเขียว		
	ซูโครส ร้อยละ10	ซูโครส ร้อยละ15	ซูโครส ร้อยละ20	ซูโครส ร้อยละ10	ซูโครส ร้อยละ15	ซูโครส ร้อยละ20	ซูโครส ร้อยละ10	ซูโครส ร้อยละ15	ซูโครส ร้อยละ20
0	$107.55^{a} \pm 4.28$	$153.78^{a} \pm 5.50$	$194.81^{a} \pm 1.56$	$106.22^{a} \pm 3.56$	$153.18^{a} \pm 2.60$	$202.07^{a} \pm 6.89$	$110.82^{a} \pm 6.07$	$150.37^{a} \pm 5.06$	$205.63^{a} \pm 3.78$
2	$104.59^{a} \pm 2.45$	$148.89^{a} \pm 7.58$	$189.93^{a} \pm 12.30$	$103.41^{a} \pm 1.56$	$145.93^{a} \pm 2.71$	$189.93^{ab} \pm 12.75$	$106.96^{ab} \pm 0.93$	$142.96^{ab} \pm 11.42$	$196.00^{ab} \pm 10.04$
4	$101.00^{ab} \pm 2.08$	$138.89^{b} \pm 4.48$	$186.11^{ab} \pm 3.08$	$97.00^{ab} \pm 3.18$	$136.67^{b} \pm 7.51$	$187.78^{bc} \pm 3.89$	$101.00^{ab} \pm 4.33$	$137.22^{ab} \pm 5.00$	$189.22^{bc} \pm 6.84$
6	$94.11^{bc} \pm 1.83$	$136.22^{bc} \pm 1.95$	$185.67^{ab} \pm 11.62$	$94.00^{abc} \pm 0.58$	$135.78^{b} \pm 2.71$	$183.67^{bc} \pm 4.25$	$95.11^{bc} \pm 0.84$	$135.33^{c} \pm 1.34$	$183.78^{bc} \pm 2.53$
8	$90.22^{cd} \pm 10.18$	$136.78^{bc} \pm 0.69$	$182.44^{ab} \pm 10.95$	$89.44^{bc} \pm 11.34$	$134.44^{b} \pm 2.50$	$173.78^{cd} \pm 8.53$	$88.22^{cd} \pm 9.53$	$134.11^{c} \pm 4.33$	$180.00^{c} \pm 5.86$
10	$81.44^{d} \pm 10.28$	$128.67^{c} \pm 4.84$	$172.22^{b} \pm 8.48$	$83.11^{c} \pm 11.66$	$119.33^{c} \pm 7.84$	$164.78^{d} \pm 5.48$	$78.22^{d} \pm 9.91$	$120.78^{d} \pm 11.02$	$167.55^{d} \pm 8.55$

หมายเหตุ

- ^{abc}ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
- ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ



รูปที่ 4.2 ปริมาณซูโครสจากการหมักของ (A)ชาอู่หลง (B) ชาดำ และ (C) ชาเขียว ที่มีความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นแตกต่างกันหมักในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน

29

4.1.3 ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติก

จากการหมักชาสามชนิดและใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสแตกต่างกัน พบว่าปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติกมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมัก ในวันสุดท้ายของการหมัก การหมักชาอู่หลงที่มีความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นร้อยละ 10 15 และ 20 มีปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติก ร้อยละ 0.70 ± 0.02 0.72 ± 0.07 และ 0.89 ± 0.10 ตามลำดับ การหมักชาดำที่มีความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นร้อยละ 10 15 และ 20 มีปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติกร้อยละ 0.58 ± 0.07 0.87 ± 0.04 และ 1.16 ± 0.06 ตามลำดับ สำหรับการหมักชาเขียวที่มีความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นร้อยละ 10 15 และ20 มีปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติกร้อยละ 0.69 ± 0.05 0.88 ± 0.03 และ 1.20 ± 0.01 ตามลำดับ จากการทดลองจะพบว่าเมื่อมีน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นสูง จะทำให้คอมบูชาที่หมักได้มีปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติกสูงตามไปด้วย โดยเฉพาะชาเขียวที่มีน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นร้อยละ 20 จะให้ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติกสูงกว่าการหมักชาชนิดอื่น แสดงดังตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.3

4.1.4 ผลผลิตเซลลูโลส

จากการเก็บเซลลูโลสที่ได้จากการหมักในวันที่ 10 ซึ่งเป็นวันสุดท้ายของการหมัก พบว่า ผลผลิตเซลลูโลสที่ได้จากการหมักชาชนิดต่างๆ จะเพิ่มตามความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้น โดยพบว่าชาอู่หลงเมื่อมีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นร้อยละ 10 15 และ 20 มีผลผลิตเซลลูโลส 5.15 ± 0.31 7.15 ± 0.09 และ 7.31 ± 0.60 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ชาดำเมื่อมีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นร้อยละ 10 15 และ 20 มีผลผลิตเซลลูโลส 9.96 ± 1.34 10. 75 ± 0.51 และ 11.42 ± 2.19 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และชาเขียวเมื่อมีความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสร้อยละ 10 15 และ 20 มีผลผลิตเซลลูโลส 4.18 ± 0.28 7.20 ±0.90 และ 7.52 ± 0.71 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 4.4 และรูปที่ 4.4 จากการทดลองจะพบว่าชาดำจะให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงกว่าชาอู่หลงและชาเขียว โดยเฉพาะชาดำที่มีความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสร้อยละ 15 และ 20

ลักษณะของเซลลูโลสที่ได้จากการหมักชาทั้งสามชนิด โดยหมักในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน แสดงดังรูปที่ 4.5

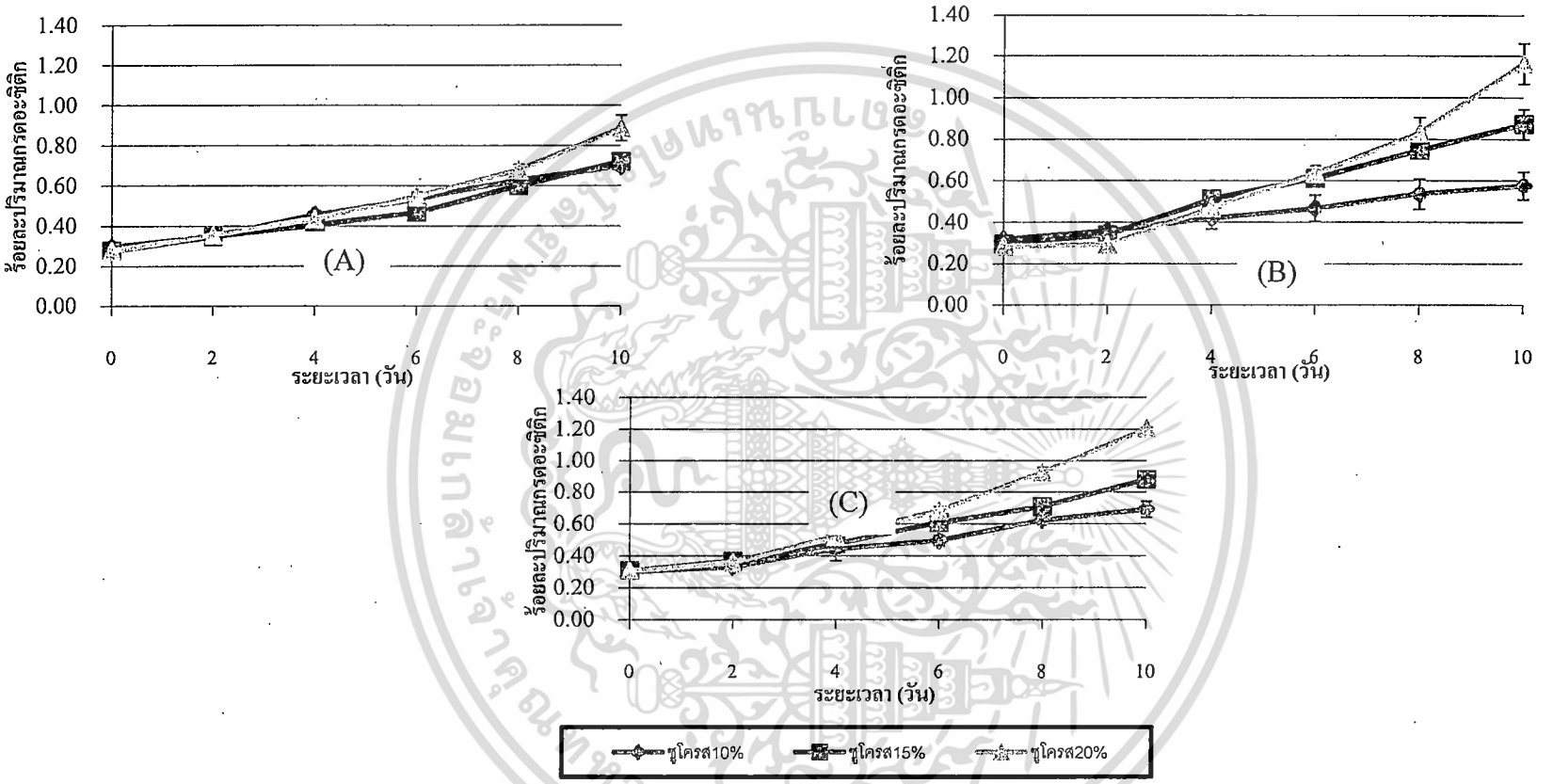
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติกในคอมบูชาที่ได้จากการหมักชาชนิดต่างๆ ที่มีความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสที่แตกต่างกัน หมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	ชนิดชา								
	ชาอู่หลง			ชาดำ			ชาเขียว		
	ซูโครส ร้อยละ10	ซูโครส ร้อยละ15	ซูโครส ร้อยละ20	ซูโครส ร้อยละ10	ซูโครส ร้อยละ15	ซูโครส ร้อยละ20	ซูโครส ร้อยละ10	ซูโครส ร้อยละ15	ซูโครส ร้อยละ20
0	$0.30^{f} \pm 0.01$	$0.28^{e} \pm 0.00$	$0.28^{e} \pm 0.00$	$0.32^{e} \pm 0.01$	$0.30^{f} \pm 0.01$	$0.29^{e} \pm 0.01$	$0.30^{c} \pm 0.02$	$0.31^{f} \pm 0.01$	$0.31^{f} \pm 0.01$
2	$0.35^{e} \pm 0.01$	$0.35^{d} \pm 0.01$	$0.36^{de} \pm 0.02$	$0.36^{de} \pm 0.02$	$0.34^{e} \pm 0.01$	$0.29^{e} \pm 0.02$	$0.33^{c} \pm 0.02$	$0.37^{e} \pm 0.02$	$0.36^{e} \pm 0.01$
4	$0.46^{d} \pm 0.02$	$0.40^{d} \pm 0.02$	$0.44^{d} \pm 0.03$	$0.42^{cd} \pm 0.05$	$0.51^{d} \pm 0.01$	$0.47^{d} \pm 0.04$	$0.45^{b} \pm 0.07$	$0.47^{d} \pm 0.03$	$0.53^{d} \pm 0.01$
6	$0.54^{c} \pm 0.02$	$0.47^{c} \pm 0.04$	$0.55^{c} \pm 0.04$	$0.47^{bc} \pm 0.06$	$0.61^{c} \pm 0.03$	$0.63^{c} \pm 0.02$	$0.50^{b} \pm 0.03$	$0.61^{c} \pm 0.01$	$0.68^{c} \pm 0.03$
8	$0.63^{b} \pm 0.01$	$0.60^{b} \pm 0.02$	$0.68^{b} \pm 0.08$	$0.54^{ab} \pm 0.07$	$0.75^{b} \pm 0.03$	$0.83^{b} \pm 0.02$	$0.62^{a} \pm 0.02$	$0.71^{b} \pm 0.01$	$0.93^{b} \pm 0.03$
10	$0.70^{a} \pm 0.02$	$0.72^{a} \pm 0.07$	$0.89^{a} \pm 0.10$	$0.58^{a} \pm 0.07$	$0.87^{a} \pm 0.04$	$1.16^{a} \pm 0.06$	$0.69^{a} \pm 0.05$	$0.88^{a} \pm 0.03$	$1.20^{a} \pm 0.01$

หมายเหตุ

- ^{abc}ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
- ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ



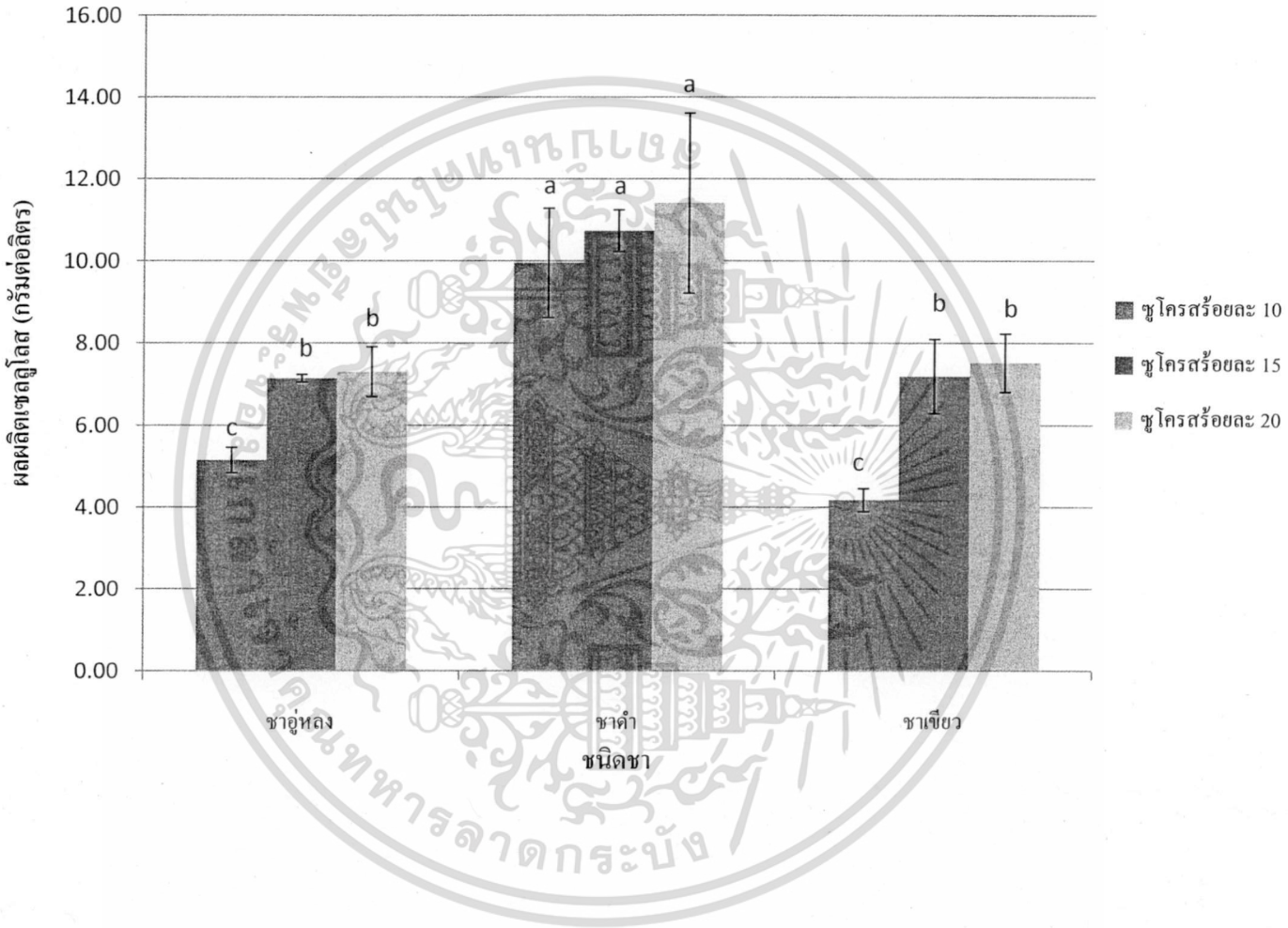
รูปที่ 4.3 ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติกจากการหมัก (A)ชาอู่หลง (B) ชาดำ และ (C) ชาเขียว ที่ความเข้มข้นซูโครสแตกต่างกัน หมักเป็นเวลา 10 วัน

ตารางที่ 4.4 ผลผลิตเซลลูโลสที่ได้จากการหมักคอมบูชาจากชาชนิดต่างๆ ที่มีความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสที่แตกต่างกัน หมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน

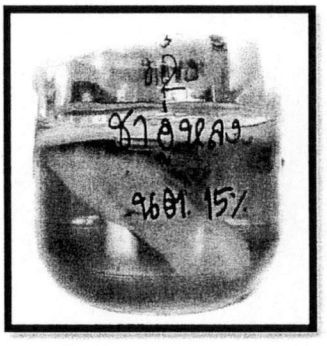
ความเข้มข้นน้ำตาลซูโครส	ผลผลิตเซลลูโลส (กรัมต่อลิตร)		
	ชาอู่หลง	ชาดำ	ชาเขียว
ร้อยละ 10	$5.15^{b} \pm 0.31$	$9.96^{b} \pm 1.34$	$4.18^{c} \pm 0.28$
ร้อยละ 15	$7.15^{b} \pm 0.09$	$10.75^{b} \pm 0.51$	$7.20^{b} \pm 0.90$
ร้อยละ 20	$7.31^{a} \pm 0.60$	$11.42^{a} \pm 2.19$	$7.52^{a} \pm 0.71$

หมายเหตุ

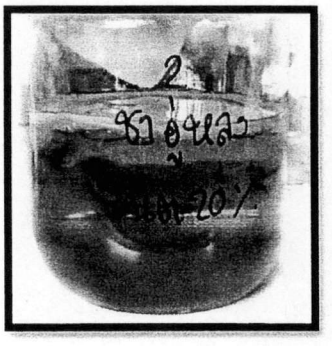
- ^{abc} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
- ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ


16.00
14.00
12.00
10.00
8.00
6.00
4.00
2.00
0.00
ผลผลิตเซลลูโลส (กรัมต่อลิตร)
a
a
a
b
b
b
c
c
ชาอู่หลง
ชาดำ
ชาเขียว
ชนิดชา
ซูโครสร้อยละ 10
ซูโครสร้อยละ 15
ซูโครสร้อยละ 20

ชาอู่หลง
ความเข้มข้นซูโครสร้อยละ 10



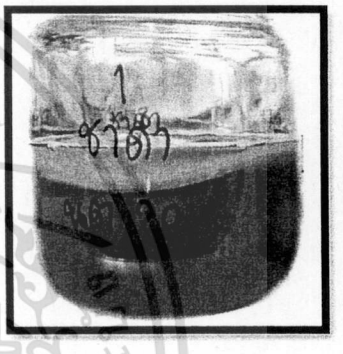
ชาอู่หลง
ความเข้มข้นซูโครสร้อยละ 15



ชาอู่หลง
ความเข้มข้นซูโครสร้อยละ 20

ชาดำ
ความเข้มข้นซูโครสร้อยละ 10

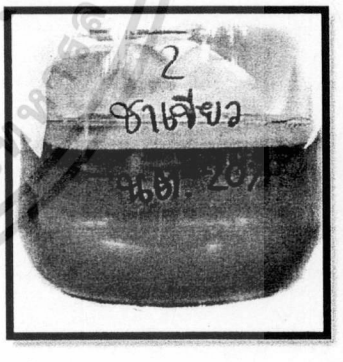
ชาดำ
ความเข้มข้นซูโครสร้อยละ 15



ชาดำ
ความเข้มข้นซูโครสร้อยละ 20

ชาเขียว
ความเข้มข้นซูโครสร้อยละ 10

ชาเขียว
ความเข้มข้นซูโครสร้อยละ 15



ชาเขียว
ความเข้มข้นซูโครสร้อยละ 20

รูปที่ 4.5 ลักษณะเซลลูโลสที่ได้จากการหมักชา 3 ชนิดได้แก่ ชาอู่หลง ชาดำ และชาเขียวที่มีความเข้มข้นซูโครสร้อยละ 10 15 และ20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

จากการวิเคราะห์ค่าพีเอช ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติก ปริมาณน้ำตาลซูโครส และผลผลิตเซลลูโลสที่ได้จากการหมักชาอู่หลง ชาดำ และชาเขียว ที่มีความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 10 15 และ20 พบว่า การหมักชาดำ และชาเขียวที่มีความเข้มข้นซูโครสร้อยละ 15 และร้อยละ 20 ให้ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติก และให้ผลผลิตเซลลูโลสสูงสุด จึงได้คัดเลือกมาใช้ในการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

จากการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์แสดงดังตารางที่ 4.5 พบว่าชาหมักคอมบูชาที่ได้จากการหมักชาดำ และชาเขียวมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบที่นำมาทดสอบ เมื่อเปรียบเทียบชนิดของชาที่นำมาทดสอบพบว่าชาแต่ละชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อที่นำมาทดสอบแตกต่างกัน ชาดำที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสร้อยละ 15 และ20 ที่ผ่านการให้ความร้อนและไม่ผ่านการให้ความร้อน มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสอยู่ในช่วง 9.88 ± 0.92 – 28.15 ± 2.67 มิลลิเมตร แสดงดังรูปที่ 4.6 และสำหรับชาเขียวที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสร้อยละ 15 และ20 ที่ผ่านการให้ความร้อนและไม่ผ่านการให้ความร้อน มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสอยู่ในช่วง 10.84 ± 1.73 – 25.78 ± 0.78 มิลลิเมตร แสดงดังตารางที่ 4.5 และรูปที่ 4.7 และพบว่าชาเขียวที่มีความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสร้อยละ 15 มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบสูงกว่าชาดำที่มีความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสร้อยละ 15 และ20 อาจเนื่องมาจากองค์ประกอบทางเคมีในชาหมักทั้งสองชนิดแตกต่างกัน

ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในชาหมักคอมบูชา จะเห็นได้ชัดเจนที่สุดในเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ซึ่งมีบริเวณโซนใสอยู่ในช่วง 21.72 ± 0.65 – 28.15 ± 2.67 มิลลิเมตร ชาหมักที่มีความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นร้อยละ 15 และ20 มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทดสอบไม่แตกต่างกัน เช่นเดียวกับชาหมักที่ผ่านการให้ความร้อน และชาหมักที่ไม่ผ่านการให้ความร้อนมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทดสอบไม่แตกต่างกันมากนัก ชาที่ไม่ผ่านการหมัก ซึ่งใช้เป็นชุดควบคุมไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบ

สำหรับชาดำ และชาเขียวที่ใช้ในการหมักคอมบูชา มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์แต่ละชนิดแตกต่างกัน โดยพบว่าชาดำที่มีความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสร้อยละ 15 และ 20 มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *B. cereus, S. aureus* และ *L. monocytogenes* ได้สูงกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ยกเว้น *V. parahaemolyticus* สำหรับชาเขียวก็เช่นเดียวกัน พบว่าชาเขียวที่ความเข้มข้นซูโครสร้อยละ 15 และ 20 มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้สูงกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ยกเว้น *V. parahaemolyticus* ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียแกรมลบมีสารไลโพพอลิแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) ที่ชั้นนอกสุดของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้สารยับยั้งเข้าสู่เซลล์ได้ยากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก (ฐาปนี และศิริกานต์, 2543)

ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ไม่ได้ขึ้นอยู่กับปริมาณกรดอะซิติก หรือกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักเท่านั้น องค์ประกอบทางเคมีอื่นๆ เช่น แบคเทอริโอซิน โปรตีน เอนไซม์ และสารประกอบฟีนอลิคที่มีในชาแต่ละชนิดก็มีผลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (Sreeramulu และคณะ 2000, 2001)

Greenwalt และคณะ (1998) ศึกษาชาหมักคอมบูชาโดยใช้ความเข้มข้นของชาดำและชาเขียวที่แตกต่างกัน พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Agrobacterium tumefaciens*, *Bacillus cereus*, *Salmonella*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

typhimurium, *Staphylococcus aureus* และ *E. coli* โดยฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เหล่านี้มาจากกรดอะซิติก ที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก นอกจากนี้การใช้ความเข้มข้นของชา ระยะเวลาการหมัก วิธีการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ มีผลทำให้ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแตกต่างกัน

เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของคอมบูชาที่ได้จากการหมักของชาดำ และชาเขียว พบว่าชาเขียวมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่นำมาทดสอบได้สูงกว่าชาดำ สอดคล้องกับการทดลองของ Hara และคณะ, 1995 เมื่อพิจารณาในด้านพฤษศาสตร์ การเก็บยอดใบชาจากพุ่มชาแล้วนำมาเข้ากระบวนการที่แตกต่างกัน ชาเขียวจะผ่านขั้นตอนการตรึง และการยับยั้งเอนไซม์ (ใบชาจะเริ่มเหี่ยวหลังจากที่เก็บมา เกิดออกซิเดชันของเอนไซม์แบบค่อยเป็นค่อยไป โดยในระหว่างขั้นตอนแรกจะนำใบชาเขียวมานึ่งทันที เพื่อหยุดกระบวนการ oxidation) ในขณะที่ชาดำรูปแบบที่นิยมมากที่สุดทั่วโลกมาจากการเกิด oxidation ของสาร polyphenol ในใบที่ผ่านกระบวนการหมักของเอนไซม์ หลายขั้นตอน (Hara และคณะ, 1995c) ดังนั้นความแตกต่างขององค์ประกอบระหว่างชา 2 ชนิด ส่งผลให้ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของชา 2 ชนิดแตกต่างกัน (Wheeler และ Wheeler, 2004) นอกจากนี้ผลของกระบวนการหมักทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบในน้ำหมักคอมบูชาที่เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายกับการเปลี่ยนรูปทางชีวเคมี (Chen และ Liu, 2000)

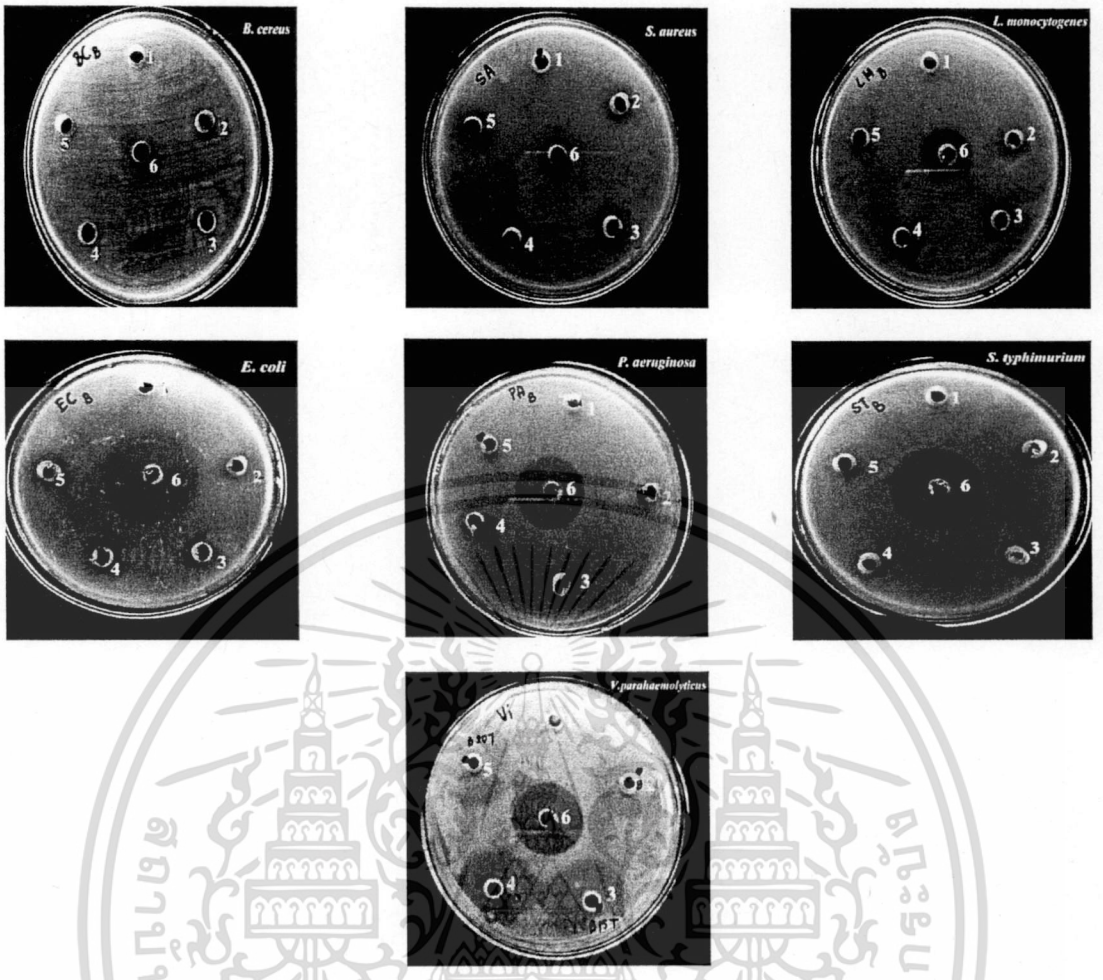
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารของชาหมักที่มีชนิดของชา และความเข้มข้นซูโครสที่แตกต่างกัน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยวิธี Agar diffusion

ชนิดชา	ความเข้มข้นน้ำตาลซูโครส (ร้อยละ)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (มิลลิเมตร) ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน						
		B. cereus	*S. aureus*	*L. monocytogenes*	*E. coli*	*P. aeruginosa*	*S. typhimurium*	*V. parahaemolyticus*
ชาดำ	15	$12.80^{bc} \pm 0.44$	$12.59^{bc} \pm 0.82$	$12.39^{c} \pm 0.06$	$13.29^{bc} \pm 0.90$	$11.87^{bc} \pm 0.94$	$11.48^{b} \pm 0.72$	$26.22^{ab} \pm 1.04$
	15T	$12.37^{bcd} \pm 0.34$	$12.58^{bc} \pm 0.31$	$9.88^{f} \pm 0.92$	$11.75^{d} \pm 1.11$	$11.84^{bc} \pm 1.11$	$10.93^{b} \pm 0.39$	$23.68^{cde} \pm 2.31$
	20	$12.31^{bcd} \pm 0.02$	$12.05^{bcd} \pm 1.83$	$11.39^{de} \pm 0.09$	$12.24^{cd} \pm 1.21$	$10.96^{c} \pm 1.51$	$11.88^{b} \pm 0.41$	$28.15^{a} \pm 2.67$
	20T	$11.29^{d} \pm 1.47$	$10.85^{d} \pm 0.42$	$10.60^{ef} \pm 0.43$	$12.03^{cd} \pm 0.07$	$10.52^{c} \pm 0.32$	$11.18^{b} \pm 1.15$	$25.04^{bcd} \pm 1.16$
ชาเขียว	15	$13.36^{b} \pm 1.21$	$14.06^{a} \pm 0.19$	$14.60^{b} \pm 0.59$	$13.98^{b} \pm 1.01$	$13.20^{b} \pm 0.54$	$12.27^{b} \pm 0.67$	$25.78^{bc} \pm 0.78$
	15T	$12.84^{bc} \pm 0.82$	$12.94^{ab} \pm 0.38$	$12.63^{c} \pm 0.29$	$13.38^{bc} \pm 0.33$	$12.77^{b} \pm 0.67$	$12.13^{b} \pm 1.27$	$22.75^{de} \pm 0.76$
	20	$12.25^{bcd} \pm 0.85$	$12.56^{bc} \pm 0.49$	$12.56^{c} \pm 0.67$	$14.32^{b} \pm 0.58$	$11.93^{bc} \pm 0.30$	$10.87^{b} \pm 1.12$	$23.84^{cde} \pm 0.41$
	20T	$11.52^{cd} \pm 0.38$	$11.64^{cd} \pm 0.56$	$12.02^{cd} \pm 0.37$	$13.17^{bc} \pm 0.81$	$11.18^{c} \pm 0.49$	$10.84^{b} \pm 1.73$	$21.72^{e} \pm 0.65$
ชุดควบคุม	B	$6.00^{e} \pm 0.00$	$6.00^{e} \pm 0.00$	$6.00^{g} \pm 0.00$	$6.00^{e} \pm 0.00$	$6.00^{d} \pm 0.00$	$6.00^{c} \pm 0.00$	$6.00^{f} \pm 0.00$
	G	$6.00^{e} \pm 0.00$	$6.00^{e} \pm 0.00$	$6.00^{g} \pm 0.00$	$6.00^{e} \pm 0.00$	$6.00^{d} \pm 0.00$	$6.00^{c} \pm 0.00$	$6.00^{f} \pm 0.00$
	ยาปฏิชีวนะ	$34.44^{a} \pm 0.52$	$11.58^{cd} \pm 0.17$	$17.79^{a} \pm 0.76$	$34.39^{a} \pm 0.47$	$27.21^{a} \pm 1.01$	$31.07^{a} \pm 1.06$	$21.88^{e} \pm 0.87$

หมายเหตุ

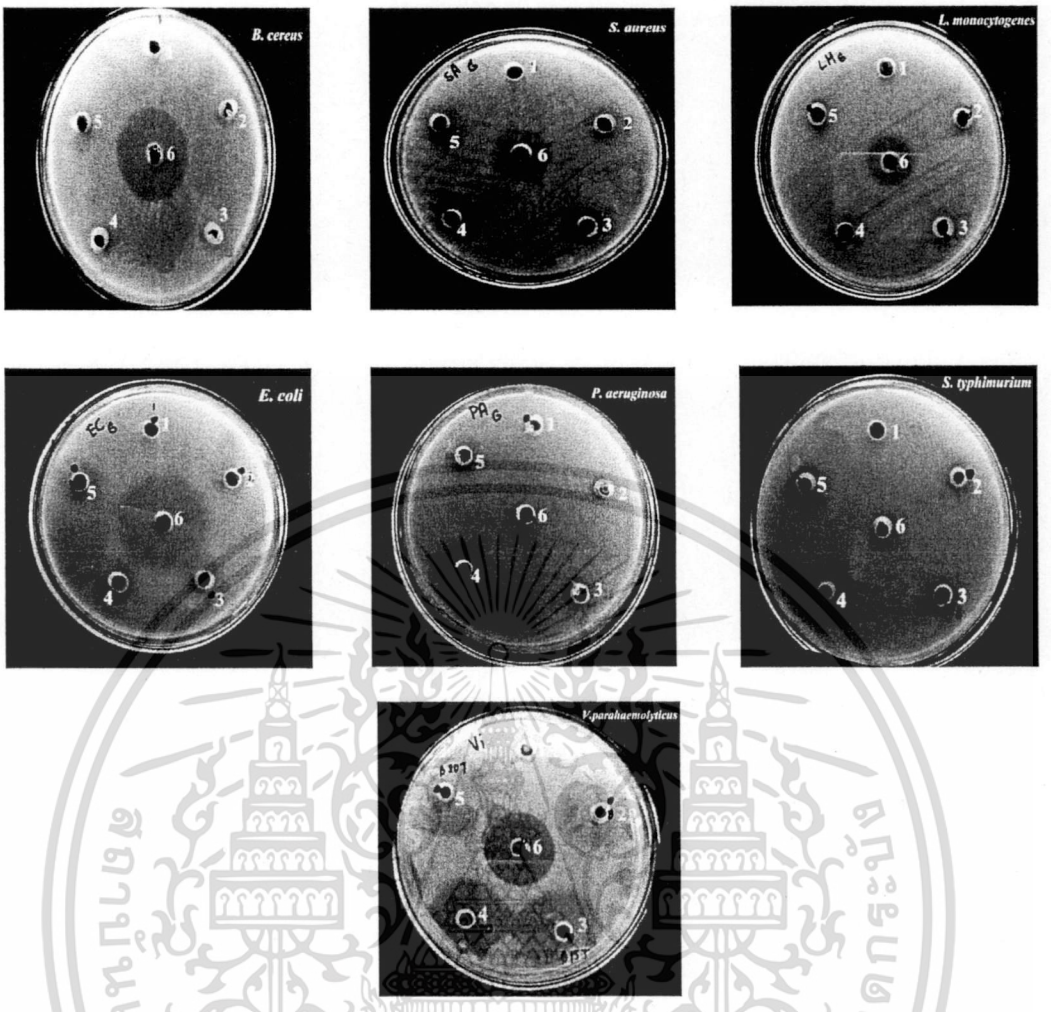
- T การให้ความร้อน 80 – 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
- ยาปฏิชีวนะ แบคทีเรียแกรมบวกใช้ Vancomycin และแบคทีเรียแกรมลบใช้ Gentamicin เป็นชุดควบคุมเชิงบวก (positive control)
- ^{abc}ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
- หลุมมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร
- B ชาดำไม่ผ่านการหมัก
- G ชาเขียวไม่ผ่านการหมัก



รูปที่ 4.6 ฤทธิ์ของคอมบูชาที่ได้จากการหมักชาดำต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus, S. aureus, L. monocytogenes, E.coli, P. aeruginosa, S. typhimurium* และ *V. parahaemolyticus*

1. ชาดำ ไม่ผ่านการเติมหัวเชื้อ
2. ชาดำ ที่มีความเข้มข้นของซูโครสร้อยละ 15
3. ชาดำ ที่มีความเข้มข้นของซูโครสร้อยละ 15 และให้ความร้อน 80 – 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
4. ชาดำ ที่มีความเข้มข้นของซูโครสร้อยละ 20
5. ชาดำ ที่มีความเข้มข้นของซูโครสร้อยละ 20 และให้ความร้อน 80 – 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
6. ยาปฏิชีวนะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 ฤทธิ์ของคอมบูชาที่ได้จากการหมักชาเขียวต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *B. cereus, S. aureus, L. monocytogenes, E.coli, P. aeruginosa, S. typhimurium* และ*V. parahaemolyticus*

1. ชาเขียว ไม่ผ่านการเติมหัวเชื้อ
2. ชาเขียว ที่มีความเข้มข้นของซูโครสร้อยละ 15
3. ชาเขียว ที่มีความเข้มข้นของซูโครสร้อยละ 15 และให้ความร้อน 80 – 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
4. ชาดำ ที่มีความเข้มข้นของซูโครสร้อยละ 20
5. ชาดำ ที่มีความเข้มข้นของซูโครสร้อยละ 20 และให้ความร้อน 80 – 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
6. ยาปฏิชีวนะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.1 ปริมาณเอทานอล

เมื่อนำชาเขียว และชาดำที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสร้อยละ 15 และ 20 หมักเป็นเวลา 10 วัน นำชาหมักแต่ละชนิดวัดปริมาณเอทานอล พบว่า ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมัก ชาดำที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสร้อยละ 15 และ 20 มีปริมาณเอทานอล คือ 3.55 ± 0.19 และ 3.67 ± 0.75 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับชาเขียวที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสร้อยละ 15 และ 20 มีปริมาณเอทานอล 3.31 ± 1.14 และ 3.18 ± 1.11 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งการนำชาดำมาหมักคอมบูชาจะให้ปริมาณเอทานอลสูงกว่าชาเขียว เมื่อนำชาหมักมาพาสเจอร์ไรซ์ที่อุณหภูมิ 80 – 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที พบว่าปริมาณเอทานอลลดลงเล็กน้อย และไม่มีความแตกต่างทางค่าสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยพบว่าชาดำที่ความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสร้อยละ 15 และ20 ที่ผ่านการให้ความร้อนที่ 80 – 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที มีปริมาณเอทานอล 3.41 ± 0.72 และ 3.38 ± 0.81 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับชาเขียวที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสร้อยละ 15 และ 20 ที่ผ่านการให้ความร้อนที่ 80 - 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที มีปริมาณเอทานอลลดลง 2.65 ± 0.05 และ 2.59 ± 0.40 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ชาดำที่มีความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสร้อยละ 15 และ 20 และที่ผ่านความร้อน มีปริมาณเอทานอลไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เช่นเดียวกับชาเขียว แสดงดังตารางที่ 4.6 และรูปที่ 4.8 การใช้ความร้อน 80 - 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ซึ่งเป็นการฆ่าเชื้อในผลิตภัณฑ์โดยการพาสเจอร์ไรซ์ มีผลทำให้ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบลดลงเล็กน้อย และการพาสเจอร์ไรซ์ทำให้เครื่องดื่มคอมบูชามีความปลอดภัยในการนำมาบริโภคมากขึ้น

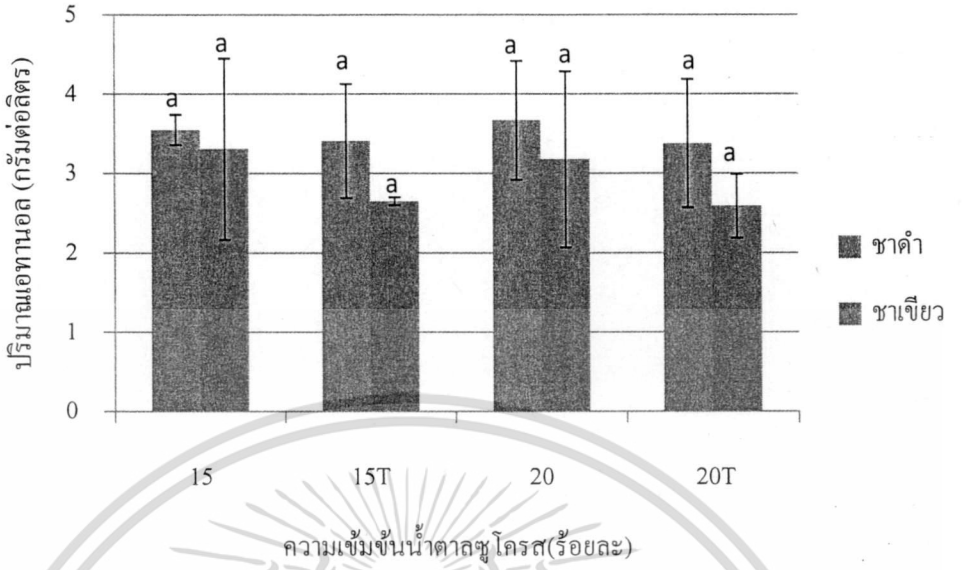
ตารางที่ 4.6 ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักชาดำ และชาเขียวที่มีความเข้มข้นซูโครสต่างกันหมักเป็นเวลา 10 วัน

ความเข้มข้นน้ำตาลซูโครส	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	
	ชาดำ	ชาเขียว
ร้อยละ 15	$3.55^{a} \pm 0.19$	$3.31^{a} \pm 1.14$
ร้อยละ 15 (ผ่านการให้ความร้อน)	$3.41^{a} \pm 0.72$	$2.65^{a} \pm 0.05$
ร้อยละ 20	$3.67^{a} \pm 0.75$	$3.18^{a} \pm 1.11$
ร้อยละ 20 (ผ่านการให้ความร้อน)	$3.38^{a} \pm 0.81$	$2.59^{a} \pm 0.40$

หมายเหตุ

^{abc}ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.8 ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักชาดำ และชาเขียวที่มีความเข้มข้นซูโครสต่างกันหมักเป็นเวลา 10 วัน

4.3 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด

จากการหมักคอมบูชาจากชาสามชนิด เป็นเวลา 10 วัน พบว่าคอมบูชาทุกชนิดมีปริมาณฟีนอลิกเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมัก ปริมาณฟีนอลิกจะสูงสุดในช่วง 8-10 วัน โดยพบว่าวันที่ 10 ของการหมักคอมบูชาจากการหมักชาดำ ชาเขียว และชาอู่หลง (ที่ไม่เจือจาง)มีปริมาณ ฟีนอลิกทั้งหมด 5.74 ± 0.01 5.73 ± 0.00 และ 5.47 ± 0.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 4.7 - 4.9 และรูปที่ 4.9 – 4.10 ทั้งนี้เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกในชาถูกย่อยสลายในระหว่างกระบวนการหมักในสภาวะที่เป็นกรด โดยเอนไซม์จากแบคทีเรียและยีสต์ที่เป็นหัวเชื้อคอมบูชา ย่อยสลายโครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกให้มีโมเลกุลเล็กลง ทำให้คอมบูชาที่ได้มีปริมาณ ฟีนอลิกเพิ่มขึ้น (Jayabalan และคณะ,2008) ซึ่งการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Lee และคณะ (2014) ซึ่งพบว่าปริมาณฟีนอลิกของคอมบูชาจะเพิ่มขึ้นตั้งแต่วันแรกจนถึงวันสุดท้ายของการหมัก และจะมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และจากการหมักคอมบูชาจากชาทั้งสามชนิด เมื่อเจือจางคอมบูชาที่ความเจือจาง 10 20 50 100 และ 200 เท่า พบว่าปริมาณฟีนอลิกจะลงลดตามความเจือจางที่เพิ่มขึ้น และเมื่อเปรียบเทียบคอมบูชาจากชาทั้งสามชนิดพบว่า จากการหมัก 10 วัน คอมบูชาจากชาดำมีปริมาณฟีนอลิกสูงกว่าชาเขียว และชาอู่หลง และมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงดังรูปที่ 4.9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 ปริมาณฟีนอลิกในคอมบูชาจากการหมักชาดำ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน

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

หมายเหตุ

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

ตารางที่ 4.8 ปริมาณฟีนอลิกในคอมบูชาจากการหมักชาเขียว ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน

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

หมายเหตุ

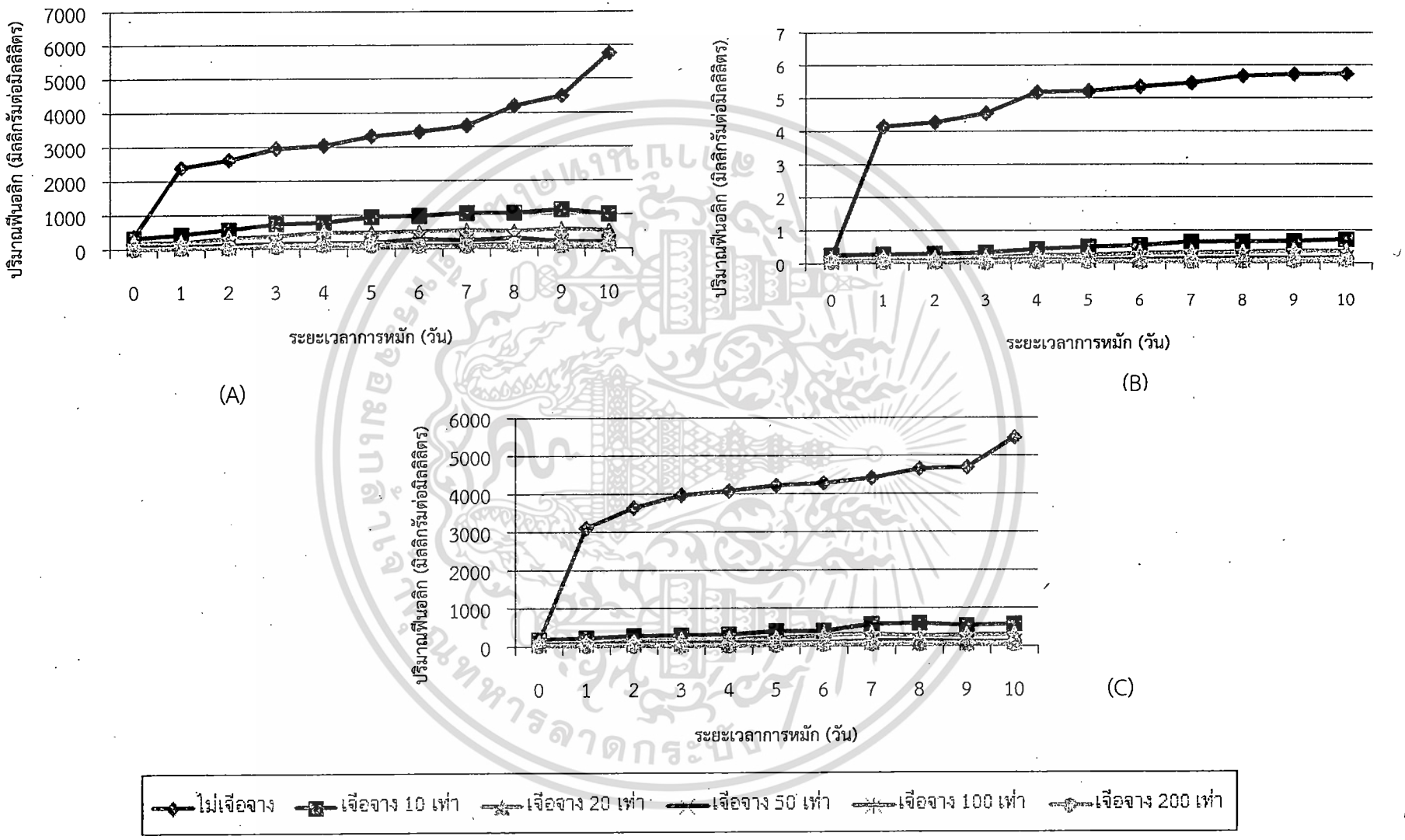
- ปริมาณฟีนอลิกแสดงในรูปค่าเฉลี่ย (Mean) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviations, SD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ
- ^{abc} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางที่ 4.9 ปริมาณฟีนอลิกในคอมบูชาจากการหมักชาอู่หลง ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน

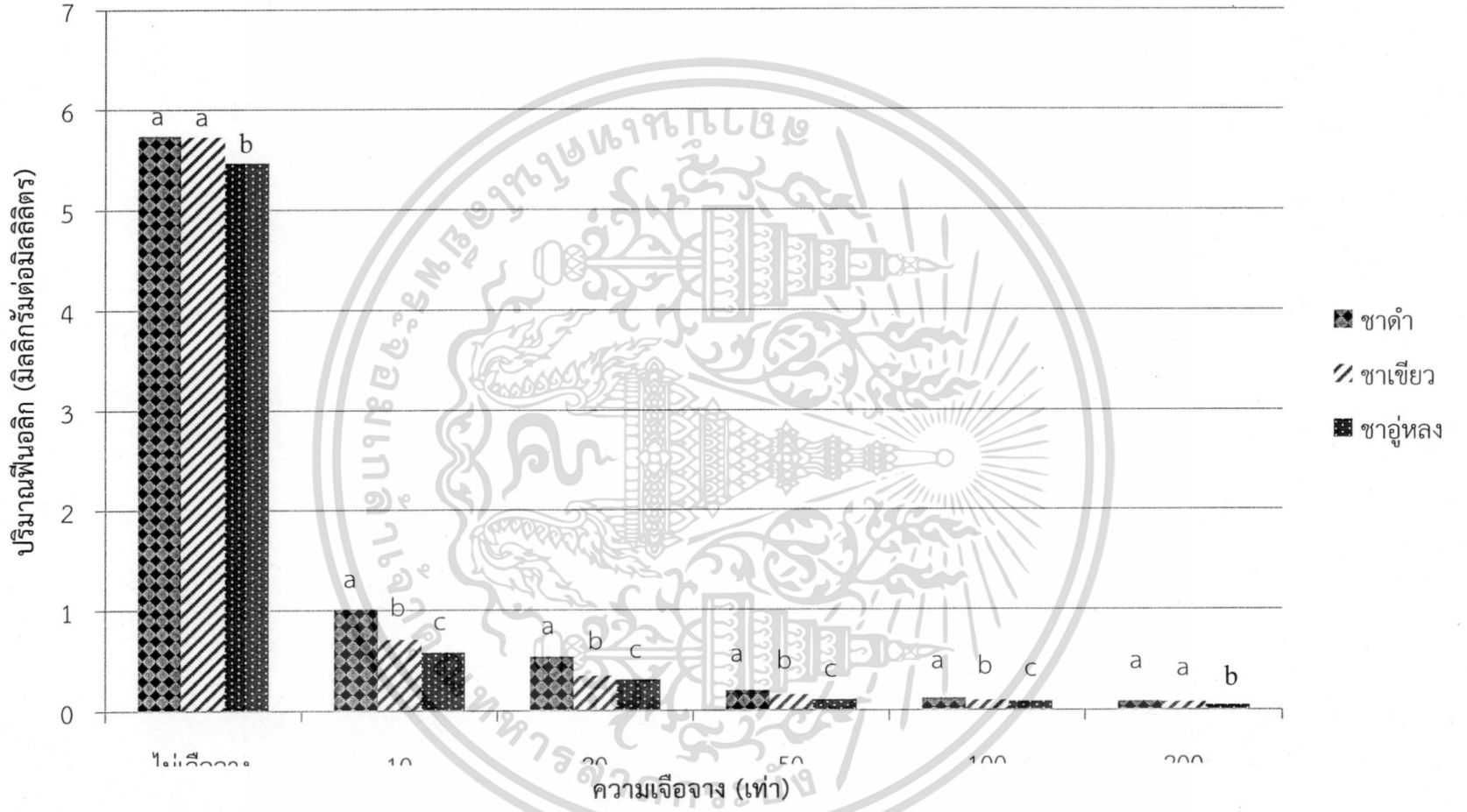
ระยะเวลาการหมัก (วัน)	ปริมาณฟีนอลิกในคอมบูชาจากการหมักชาอู่หลง (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)					
	ไม่เจือจาง	เจือจาง 10 เท่า	เจือจาง 20 เท่า	เจือจาง 50 เท่า	เจือจาง 100 เท่า	เจือจาง 200 เท่า
0	$0.15^{k} \pm 0.01$	$0.19^{i} \pm 0.00$	$0.10^{i} \pm 0.01$	$0.06^{g} \pm 0.00$	$0.04^{d} \pm 0.01$	$0.02^{de} \pm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

หมายเหตุ

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



รูปที่ 4.9 ปริมาณฟีนอลิกในคอมบูชาจากการหมัก (A) ชาดำ (B) ชาเขียว และ (C) ชาอู่หลง ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน



รูปที่ 4.10 เปรียบเทียบปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในคอมบูชาจากการหมักชาชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิห้อง ในวันที่ 10

4.4 การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธีดีพีพีเอช (DPPH radical scavenging)

จากการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวีธีดีพีพีเอชของคอมบูชาจากชาทั้งสามชนิด พบว่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการหมัก และสูงสุดในวันสุดท้ายของการหมัก (วันที่ 10) และมีความแตกต่างทางสถิติกับการหมักในช่วงแรกของการหมัก (1 – 5 วัน) แสดงดังตารางที่ 4.10 – 4.12 จากการหมักคอมบูชาจากชาทั้งสามชนิด เมื่อเจือจางคอมบูชาที่ความเจือจาง 10 20 เท่า วิเคราะห์ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชของคอมบูชาทั้งสามชนิดมีค่าสูงมากเกิน 100% จึงได้ทำการเจือจางเพิ่มขึ้นเป็น 50 100 200 และ 500 เท่าของคอมบูชาจากชาทั้งสามชนิด พบว่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชจะลดลงตามความเจือจางที่เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบคอมบูชาจากชาทั้งสามชนิด พบว่าจากการหมัก 10 วัน คอมบูชาจากชาดำมีร้อยละการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชสูงกว่าชาเขียวและชาอู่หลงและมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงดังรูปที่ 4.11 ซึ่งผลงานวิจัยของ Jayabalan และคณะ (2008) ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของคอมบูชาระหว่างการหมักเป็นเวลา 18 วัน พบว่าค่าการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอช เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมัก และสูงสุดวันที่ 18 ของการหมัก ขณะที่การทดลองของ Theppakorn (2012) พบว่าคอมบูชาจากการหมักชาเขียวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชสูงกว่าชาดำ และชาอู่หลง เนื่องจากชาเขียวเป็นชาที่ไม่ผ่านการหมัก ชาอู่หลงเป็นชาที่หมักเพียงบางส่วน และชาดำเป็นชาที่หมักอย่างสมบูรณ์ ทำให้องค์ประกอบทางเคมีของชาเขียวส่วนใหญ่คล้ายใบชาสด ซึ่งมีปริมาณคาเทชินสูง ส่วนชาดำและชาอู่หลงซึ่งผ่านกระบวนการหมัก กระบวนการหมักทำให้เอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดสเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของคาเทชิน และเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน และจากการทดลองของ Nishidai และคณะ (2000) ทำการหมักน้ำส้มสายชูโดยแบคทีเรียที่ผลิตกรดอะซิติกโดยใช้สารตั้งต้นที่ต่างกัน ทำให้เห็นว่าการหมักน้ำส้มสายชูโดยใช้สารตั้งต้นที่อุดมไปด้วยกรดฟีนอลิก ส่งผลให้มีการกำจัดอนุมูลอิสระดีพีพีเอชสูงที่สุด

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.10 ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชของชาหมักคอมบูชาจากการหมักชาดำที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน

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

หมายเหตุ

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.11 ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชของชาหมักคอมบูชาจากการหมักชาเขียว ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน

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

หมายเหตุ

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

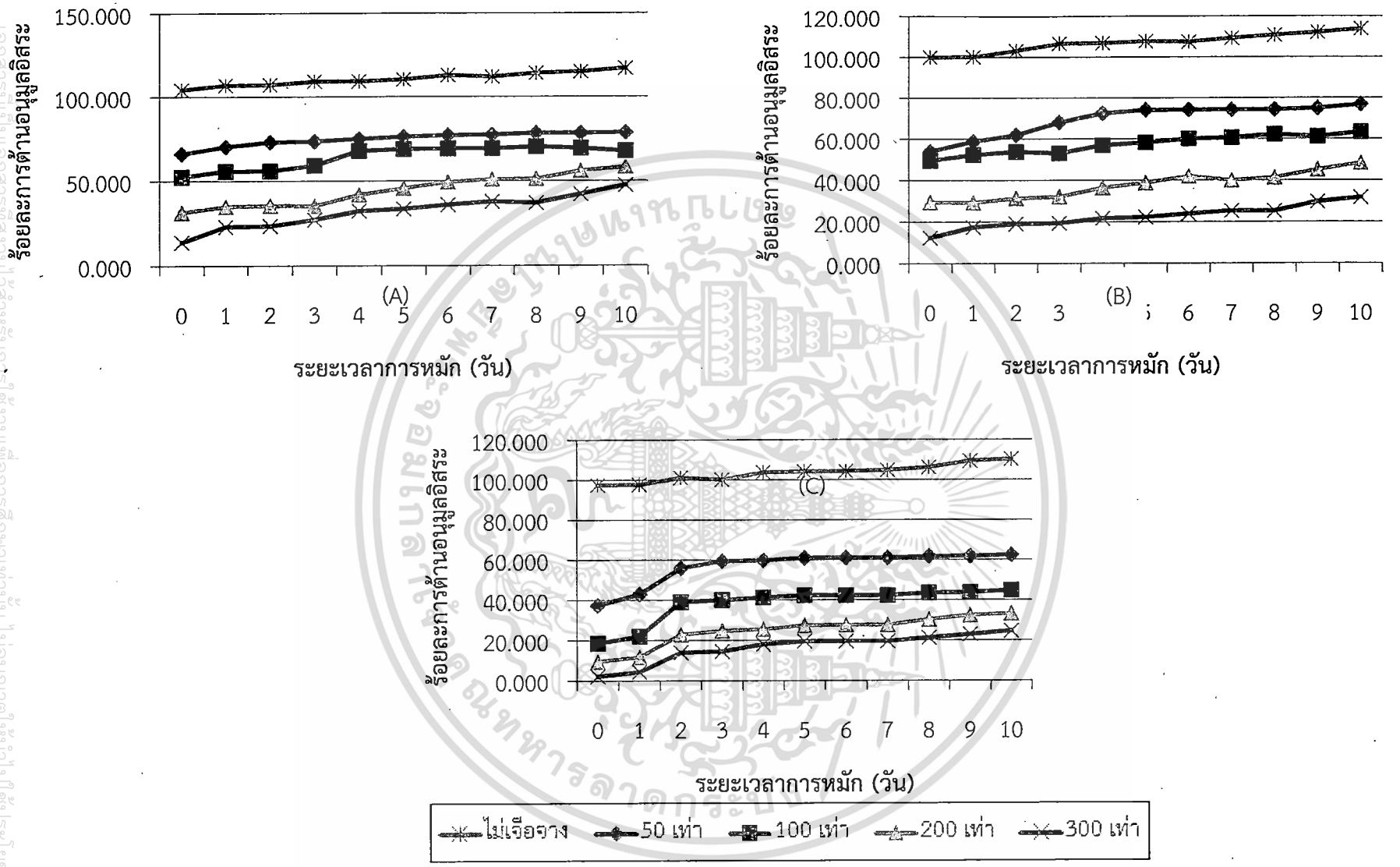
ตารางที่ 4.12 ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชของชาหมักคอมบูชาจากการหมักชาอู่หลงที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน

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

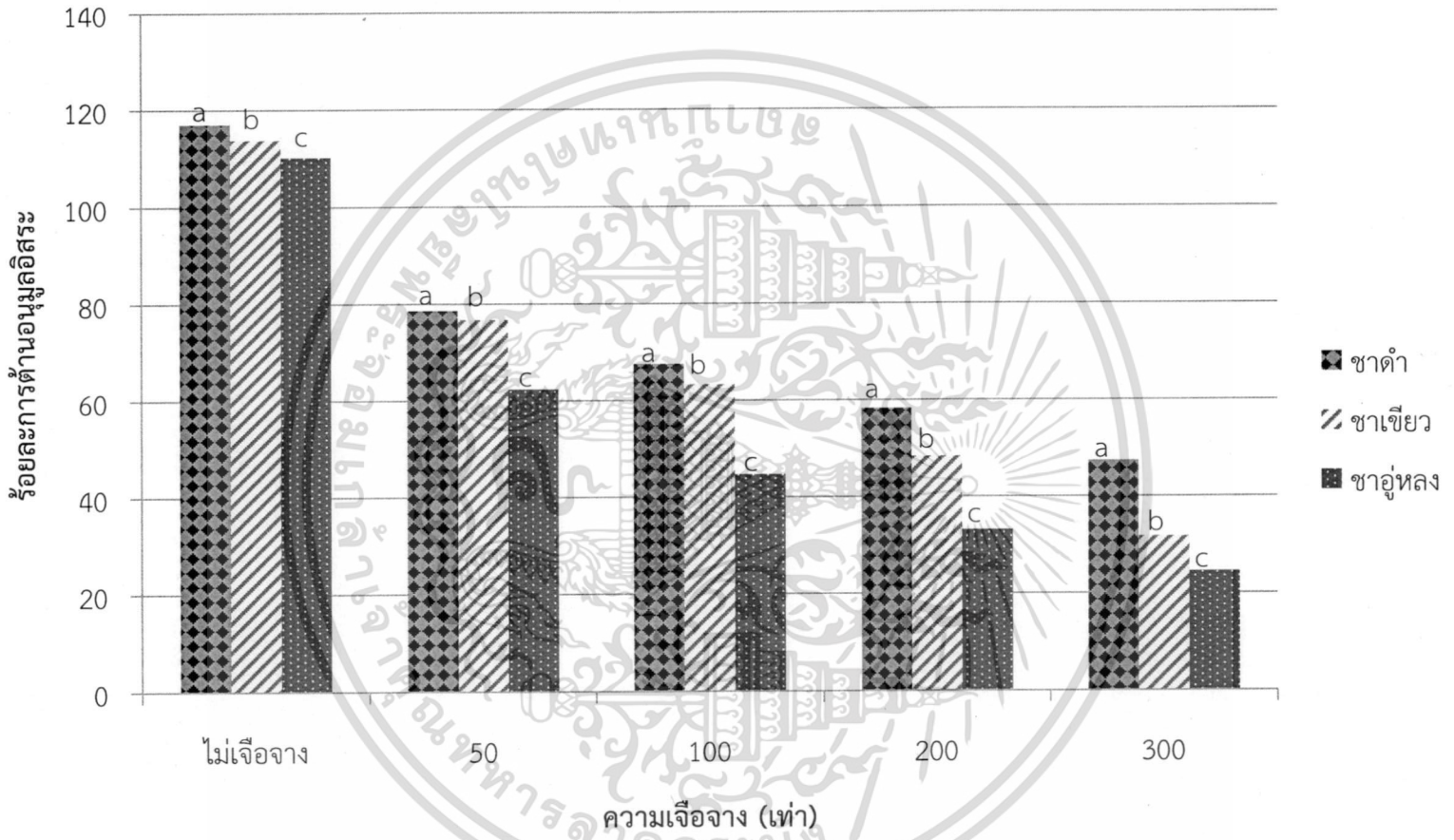
หมายเหตุ

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

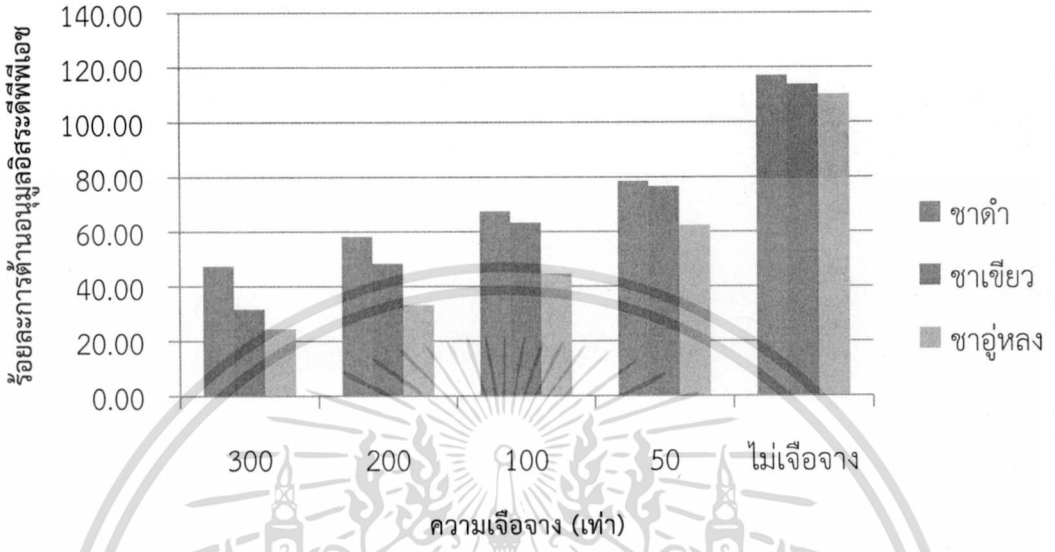


รูปที่ 4.11 ร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชของชาหมักคอมบูชา (A) ชาดำ (B) ชาเขียว และ (C) ชาอู่หลง ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน



รูปที่ 4.12 เปรียบเทียบร้อยละของการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชของชาหมักคอมบูชาชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิห้อง ในวันที่ 10

จากค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชในวันสุดท้ายของการหมักคอมบูชา ค่า IC_{50} ของชาดำและชาเขียวที่ความเจือจาง 200 เท่า มีร้อยละการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอช 58.31 ± 0.62 และ 48.33 ± 1.24 ตามลำดับ ชาอู่หลงที่ความเจือจาง 100 เท่า มีร้อยละการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอช 44.72 ± 2.62 แสดงดังรูปที่ 4.13



รูปที่ 4.13 แสดงร้อยละการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชในวันที่ 10 ของการหมักคอมบูชาจากชาดำ ชาเขียว และ ชาอู่หลง ในวันที่ 10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

น้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตขนมจีนมีอยู่ 2 ส่วน คือน้ำซาวข้าว และน้ำต้มเส้นขนมจีน มาผสมกับ จากการศึกษาชนิดของชาและความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นที่เหมาะสมในการหมักคอมบูชา พบว่าชาดำ และชาเขียวที่มีความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นร้อยละ 15 และ 20 มีปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติกสูง และมีผลผลิตเซลลูโลสสูง โดยพบว่าชาดำที่มีความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสร้อยละ 15 และ 20 มีปริมาณกรดอะซิติกร้อยละ 0.87 ± 0.04 และ 1.16 ± 0.06 ตามลำดับ สำหรับชาเขียวที่มีความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสร้อยละ 15 และ 20 มีปริมาณกรดอะซิติกร้อยละ 0.88 ± 0.03 และ 1.20 ± 0.01 ตามลำดับ ในวันสุดท้ายของการหมัก (วันที่ 10) ผลผลิตเซลลูโลสในวันที่ 10 ของการหมัก พบว่าชาดำที่มีความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสร้อยละ 15 และ 20 มีผลผลิตเซลลูโลสสูง 10.75 ± 0.51 กรัมต่อลิตร และ 11.42 ± 2.19 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับชาเขียวที่มีความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสร้อยละ 15 และ 20 มีผลผลิตเซลลูโลสสูง 7.20 ± 0.90 กรัมต่อลิตร และ 7.52 ± 0.71 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอช และปริมาณน้ำตาลซูโครสระหว่างการหมัก จะลดลงตลอดระยะเวลาการหมัก จึงนำชาดำ และชาเขียวที่มีความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสร้อยละ 15 และ 20 มาศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยวิธี agar diffusion พบว่าทั้งชาดำ และชาเขียวที่มีความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสร้อยละ 15 และ 20 มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *B. cereus*, *S. aureus* และ *L. monocytogenes* ได้สูงกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ยกเว้น *V. parahaemolyticus* ซึ่งชาทั้งสองชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้ดีมากอย่างเห็นได้ชัดเจน โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสในช่วง 23.84 ± 0.41 – 28.15 ± 2.67 มิลลิเมตร และจากการศึกษา พบว่าเมื่อนำชาเขียวมาหมักคอมบูชาจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่นำมาทดสอบสูงกว่าชาดำ

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

จะเห็นได้ว่าการหมักคอมบูชาจากชาดำเป็นระยะเวลา 10 วัน จะทำให้คอมบูชาที่ได้มีปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติกสูง ปริมาณฟีนอลิกสูงและมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระดีพีพีเอชสูงกว่าคอมบูชาที่ได้จากชาเขียว และชาอู่หลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ดุษณี ธนะบริพัฒน์. 2555. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ : วี.เจ.พริ้นติ้ง.

ฐาปนี จิตภักดี และศิริกานต์ กันทาใจ. 2543. การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตสารยับยั้งแบคทีเรีย. ปริญญานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. [online]. Available : http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:HrPflkcPLqUJ:doi1.nrct.go.th/%3Fpage%3Ddownload_digital_file

นิรมล อุตมอ่าง. 2553. การพัฒนากรรมวิธีการทำแห้งชาเขียว และสมุนไพรขมิ้นชันด้วยเทคโนโลยี. [online]. Available : file:///C:/Users/Administrator.WINDOWSQBUK6QC/Downloads/Fulltext%232_27538%20%282%29.pdf

บงกชวรรณ สุตะพาหะ และบรรยง คันธวะ. 2554. การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและเชื้อราจากสารสกัดใบฟักข้าว. [online]. Available : http://www.ams.cmu.ac.th/journal/attachments/article/437/Pages%2031-37%20from%20670S0D0D-6.pdf.

บัญญัติ สุขศรีงาม. 2521. การใช้สารปฏิชีวนะ (antibiotics). [online]. Available : http://microorganism-cowboy2007.blogspot.com/.

ประภัสสร สุรวัฒนาวรรณ. 2557. ชาเขียว. [online]. Available : https://www.gpo.or.th/rdi/html/greentea.html. (25 สิงหาคม 2557)

พรรัตน์ สินชัยพานิช. 2550. "จุลินทรีย์ที่พบในชาหมักคอมบูชา." วารสารอาหาร. 37(1) : 33-38

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนาปนนท์. 2554. โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส. [online]. Available : http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/0612/cellulose (8กันยายน 2557)

พาณี ศิริอาด, สุรพล นธการกิจกุล, สกุณณี บวรสมบัติ, ฉัตรชัย กิติพรชัย และยิ่งมณี ตระกูลพัว. 2557. การพัฒนาเครื่องดื่มชาหมักชีวภาพ รายงานฉบับสมบูรณ์ กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม

สถาบันชา มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง. 2554. ชาเขียว. [online]. Available : http://teainstitutemfu.com/main/blog/ชาเขียว (25 มกราคม 2558)

สถาบันชา มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง. 2554. ชาอู่หลง. [online]. Available : http://teainstitutemfu.com/main/blog/ชาอู่หลง (25 มกราคม 2558)

สถาบันชา มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง. 2554. ชาดำ. [online]. Available : http://teainstitutemfu.com/main/blog/ชาดำ (25 มกราคม 2558)

สถาบันชา มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง. 2554. กระบวนการผลิตชาเขียว ชาอู่หลง และชาดำ. [online]. Available : http://teainstitu temfu.com/main/blog/กระบวนการผลิตชา (25 มกราคม 2558)

สนธิรัตน์ เจริญรักษ์. 2556. การผลิตเครื่องดื่มชาหมักคอมบูชาโดยเชื้อบริสุทธิ์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาประยุกต์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สายสมร ลำยอง. 2557. เครื่องดื่มชาหมักคอมบูชา. [online]. Available : http://yaamata.blogspot.com/2011/10/kombucha.html. (25 สิงหาคม 2557)

Battikh, H., Chieb, K., Bakhrouf, A. and Ammar, E. 2013. Antibacterial and antifungal activities of black and green kombucha teas. *Journal of Food Biochemistry*. 37 : 231-236.

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

Deinema, M.H., and Zevenhuizen. L.P. 1971. Formation of cellulose fibrils by gram-negative bacteria and their role in bacterial flocculation. *Arch Mikrobiol*. 78(1) : 42-51.

Dufresne, C. and Farnworth, E. 2000. Tea, Kombucha and health: A review . *Food Res.* Intern. 33 : 409-421.

Frank, G. W. 1995. Kombucha - Healthy beverage and natural remedy from the far east, ninth ed. Wilhelm Ennsthaler, Austria. pp : 150

Greenwalt, C.J., Dufersne and Farnworth. 2000. เครื่องดื่มชาหมักคอมบูชา. [online]. Available : http://happyherbalist.com; http://w3.trib.com/~kombu/FAQ.

Greenwalt, C.J., Ledford, R.A. and Steinkraus, K.H. 1998. Determination and characterization of the antimicrobial activity of the fermented tea kombucha. *Lebensm. Wiss. Technol.* 31 : 291-296.

Greenwalt, C.J. 1997. Antibiotic activity of the fermented tea kombucha. [online]. Available : http://www.happyherbalist.com/analysis_of_kt_cornell.htm

Hara, Y., Luo, S.-J., Wickremashinghe, R. L., and Yamanishi, T. 1995. Botany (of tea). *Food Reviews International.* 11 : 371-374.

Haigler, C. H. 1985. The functions and biogenesis of native cellulose. Cellulose chemistry and its applications pp : 30-83

Hobbs, C. 1995. Kombucha manchurian tea mushroom : The Essential Guide. Botanica Press, Santa Cruz.

Kersters, K., Lisdiyanti, P., Komagata, K. and Swings, J. 2006. ลักษณะของเชื้อ Acetobacter. [online]. Available : http://archive.lib.cmu.ac.th/full/T/2554/biol20454sp_ch2.pdf

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

Malbaša, R., Lončar, E., Djurić, M. and Došenovic, I. 2008. Effect of sucrose concentration on the products of Kombucha fermentation on molasses. *Food Chemistry*. 108 : 926–932

Ross, P., Mayer, R. and Benziman, M. 1991. การสังเคราะห์เซลลูโลส. [online]. Available : http://archive.lib.cmu.ac.th/full/T/2554/biol20454sp_ch2.pdf.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Saxena, IM. And Brown, Jr. 1989. *Acetobacter xylinum*: A genetic approach. In : cellulose and wood. *Chemistry and Technology.* pp : 537-55

Sreeramulu, G., Zhu, Y. and Knol, W. 2000. Kombucha fermentation and its antimicrobial activity. *J.Agric. Food Chem.* 48 : 2589-2594.

Sreeramulu, G., Zhu, Y. and Knol, W. 2001. Characterization of antimicrobial activity in kombucha fermentation. *Acta Biotechnol.* 21 : 49-56.

Steinkraus, K.H., Shapiro, K.B., Hotchkiss, J.H. and Mortlock, P.R. 1996. Investigations into the antibiotic activity of tea fungus kombucha beverage. *Acta Biotechnol.* 16 : 199-205.

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

Wheeler, D.S. and Wheeler, W.J. 2004. The medicinal chemistry of tea drug development research. 61 : 45–65.

Williams, W.S. and Cannon, R.E. 1989. การสังเคราะห์เซลลูโลส [online]. Available : http://archive.lib.cmu.ac.th/full/T/2554/biol20454sp_ch2.pdf.

[online]. Available : http://www.vtnews.vt.edu/articles/2008/11/images/M_08680gatenholm-jpg.jpg (8กันยายน 2557)

[online]. Available : http://pvtridvs.net/pool/users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/Y/Yeast.html (30 สิงหาคม 2557)

[online]. Available : http://coursewares.mju.ac.th:81/elearning50/FT320/0 82.htm (24 มกราคม 2558)

[online]. Available : http://www.thaieditorial.com/กลไกการออกฤทธิ์ของสาร/ (24 มกราคม 2558)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้