

การผลิตคอมบูชาที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากชาดำและกระเจี๊ยบแดงด้วยเชื้อ  
*Acetobacter pasteurianus* AJ605 และเชื้อ *Zygosaccharomyces*  
*bailii* YN403

PRODUCTION OF KOMBUCHA WITH ANTIOXIDANT ACTIVITY  
FROM BLACK TEA AND ROSELLE BY *Acetobacter pasteurianus*  
AJ605 AND *Zygosaccharomyces bailii* YN403



วิทยานิพนธ์นี้สำหรับการศึกษิตตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ  
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
พ.ศ. 2565

KMITL-2022-SC-M-020-139

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

PRODUCTION OF KOMBUCHA WITH ANTIOXIDANT ACTIVITY  
FROM BLACK TEA AND ROSELLE BY *Acetobacter pasteurianus*  
AJ605 AND *Zygosaccharomyces bailii* YN403



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR THE  
DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY  
DEPARTMENT OF BIOLOGY SCHOOL OF SCIENCE  
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG  
2022

KMITL-2022-SC-M-020-139

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2022

SCHOOL OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตคอมบูชาที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากชาดำและ กระเจี๊ยบแดงด้วยเชื้อ <i>Acetobacter pasteurianus</i> AJ605 และเชื้อ <i>Zygosaccharomyces bailii</i> YN403
ชื่อนักศึกษา	นางสาวธัญญรัตน์ สุทธิพัฒน์กุล
รหัสประจำตัว	62605065
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
พ.ศ.	2565
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รองศาสตราจารย์ ดวงใจ โอชัยกุล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. ภก. ศุภโชค มั่งมุล

### บทคัดย่อ

คอมบูชาจัดเป็นเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ ผลิตด้วยวิธีการหมักน้ำชาผสมน้ำตาลทรายด้วยเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ งานวิจัยนี้มุ่งหวังในการพัฒนากระบวนการหมักคอมบูชาโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากกระบวนการหมักคอมบูชาก่อนหน้านี้ และนำกระเจี๊ยบแดงซึ่งเป็นสมุนไพรไทยมาผสมเพื่อปรับปรุงรสชาติของคอมบูชา นอกจากนี้ยังมุ่งหวังที่จะพัฒนาลักษณะของคอมบูชาให้เป็นรูปแบบผงและได้รับการยอมรับจากผู้บริโภค จากการศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของเชื้อ แบคทีเรีย *Acetobacter pasteurianus* AJ605 และเชื้อยีสต์ *Zygosaccharomyces bailii* YN403 ในการหมักคอมบูชาเป็นเวลา 10 วัน พบว่าปริมาณเชื้อแบคทีเรียเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เชื้อยีสต์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 3 และช้าลงในวันที่ 7 ปริมาณน้ำตาลลดลง พีเอชลดลง ในขณะที่ปริมาณกรดและเอทานอลเพิ่มขึ้น อีกทั้งสารประกอบชีวภาพและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาการหมัก คอมบูชาหมักด้วยเชื้อแบคทีเรีย *A. pasteurianus* AJ605 และเชื้อยีสต์ *Z. bailii* YN403 อัตราส่วน 8:2 มีค่า  $IC_{50}$  ของ DPPH และ ABTS สูงสุดเท่ากับ  $2.84 \pm 0.21$  มิลลิกรัมสมมูลกรดแอสคอร์บิกต่อมิลลิลิตร และ  $2.37 \pm 0.03$  มิลลิกรัมสมมูลโทรลอกซ์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังนั้นจึงทำการเลือกอัตราส่วนเชื้อแบคทีเรียต่อยีสต์ 8:2 ไปศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของชาดำต่อกระเจี๊ยบเพื่อปรับปรุงคุณภาพและรสชาติของคอมบูชาพบว่า คอมบูชาจากชาดำผสมกระเจี๊ยบอัตราส่วน 8:2 มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS สูง โดยมีค่า  $IC_{50}$   $3.06 \pm 0.07$  มิลลิกรัมสมมูลกรดแอสคอร์บิกต่อมิลลิลิตร และ  $3.44 \pm 0.22$  มิลลิกรัมสมมูลโทรลอกซ์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากการศึกษาวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี ปริมาณสารประกอบทางชีวภาพ และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่หรือใช้โดยไม่ได้รับอนุญาต  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ พบว่าคอมบูชาจากชาดำผสมกระเจี๊ยบอัตราส่วน 8:2 เป็นเวลา 10 วัน มีคุณสมบัติเหมาะสมที่จะนำไปผลิตเป็นเครื่องดื่มต่อไป และจากการศึกษาการแปรรูปคอมบูชาเป็นผงเครื่องดื่มโดยผสมกับมอลโตเด็กซ์ทริน พบว่าคอมบูชาจากชาดำผสมกระเจี๊ยบที่ผสมมอลโตเด็กซ์ทรินร้อยละ 15 สามารถรักษาสารประกอบชีวภาพได้ดี และยังมีสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูง นอกจากนี้เมื่อทำการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสพบว่าผู้บริโภคส่วนใหญ่ให้คะแนนความชอบและความพึงพอใจในผงคอมบูชาจากชาดำผสมกระเจี๊ยบที่นำมาละลาย โดยได้รับคะแนนสูงสุดทั้งในด้าน ความใส สี กลิ่น รสชาติ และความชอบโดยรวม

**คำสำคัญ** : กระเจี๊ยบแดง คอมบูชา ชาดำ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มอลโตเด็กซ์ทริน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Production of kombucha with antioxidant activity from black tea and roselle by <i>Acetobacter pasteurianus</i> AJ605 and <i>Zygosaccharomyces bailii</i> YN403
Student Name	Miss Tanyarat Sutthiphatkul
Student ID	62605065
Degree	Master of Science (Biotechnology)
Department	Biology
Year	2022
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Duangjai Ochaikul
Thesis Co-advisor	Assoc. Prof. Dr. Supachoke Mangmool

### Abstract

Kombucha is a functional beverage made from the fermentation of sweet tea by bacteria and yeast. The aim of the present study is to improve a kombucha fermentation process using isolated microorganisms from the fermentation process. Furthermore, roselle is used to improve the characteristics and flavor of kombucha. Lastly, it aims to prepare kombucha powder and investigate its properties with customer acceptance. The optimal bacterium *Acetobacter pasteurianus* AJ605 and the yeast *Zygosaccharomyces bailii* YN403 ratios for kombucha production were investigated. On the day 3<sup>rd</sup>, the bacterial colony rapidly increased. The yeast culture rapidly grew at first, but then slowed on the day 7<sup>th</sup>. Sugar and pH levels declined, while acid and ethanol levels increased. Furthermore, during the fermentation process, the bioactive compounds and antioxidant activity changed. Kombucha is produced through the fermentation using different ratio of bacteria and yeast. The DPPH and ABTS IC<sub>50</sub> of *A. pasteurianus* AJ605 and yeast strain *Z. bailii* YN403 were 2.84±0.21 mg ascorbic acid equivalent/ml and 2.37±0.03 mg trolox equivalent/ml, respectively, in an 8:2 ratio. The result showed that an 8:2 bacteria-to-yeast ratio was optimal and

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

chosen. The roselle affects the chemical quality of kombucha when investigating the optimal ratio of roselle to improve the quality and the taste of kombucha. After 10 days of fermentation, kombucha made from 8:2, ratio of black tea and roselle showed a high antioxidant capacity, DPPH, and ABTS, with  $IC_{50}$  values of  $3.06 \pm 0.07$  mg ascorbic acid equivalent/ml and  $3.44 \pm 0.07$  mg ascorbic acid equivalent/ml, respectively. Based on chemical quality analysis, bioactive compounds, and antioxidant capacity, it was discovered that kombucha made from black tea and roselle in an 8:2 ratio for 10 days was suitable for further beverage production. For a powdered drink, kombucha is combined with maltodextrin-based powder. It was discovered that kombucha made from roselle black tea and 15% maltodextrin could effectively preserve bioactive compounds and showed a high antioxidant capacity. Furthermore, when sensory quality was evaluated, it was discovered that the majority of consumers preferred and were satisfied with the dissolved black tea mixed with roselle kombucha powder. It got the highest marks for clarity, color, smell, taste, and overall likeness.

**Keywords** : Antioxidant activity, Black tea, Kombucha, Maltodextrin, Roselle

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีจากการได้รับคำปรึกษา และคำแนะนำจาก รองศาสตราจารย์ดวงใจ โอชัยกุล อาจารย์ที่ปรึกษา และรองศาสตราจารย์ ดร. ภก. ศุภโชค มั่งมุล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำตลอดระยะเวลาในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ของข้าพเจ้า

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. อรไท สุขเจริญ และ รองศาสตราจารย์ ดร. สรัญญา พันธุ์พฤษ์ ผู้เป็นประธานและกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้คำแนะนำรวมทั้ง แนวทางในการดำเนินการวิจัยให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น รวมทั้งอาจารย์ทุกท่านที่ได้ให้คำปรึกษา และ ความช่วยเหลือต่างๆ ตลอดการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง ที่ได้มอบทุนอุดหนุนการศึกษาในระดับปริญญาโทตลอดระยะเวลา 2 ปี รวมทั้งขอบคุณพี่ เพื่อน และน้อง จากห้องปฏิบัติการนักศึกษาระดับปริญญาโท คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยี พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่คอยให้คำแนะนำและให้กำลังใจเสมอมา

นอกจากนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัว ที่คอยให้กำลังใจ การสนับสนุนที่ดีเสมอมาจนกระทั่งข้าพเจ้าสำเร็จการศึกษา

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณดีอันเกิดจากคุณค่าและประโยชน์จากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้แก่ คณาจารย์ผู้ให้ความรู้ บิดา มารดา และครอบครัวของข้าพเจ้า ตลอดจนผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องทุกท่าน

นางสาวธัญญรัตน์ สุทธิพัฒน์กุล

# สารบัญ

	หน้า
สารบัญ.....	ก
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูป.....	ญ
<b>บทที่ 1 บทนำ.....</b>	<b>1</b>
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
<b>บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....</b>	<b>4</b>
2.1 คอมบูชา (Kombucha).....	4
2.1.1 ลักษณะของคอมบูชา.....	4
2.1.2 ประวัติที่มาของเครื่องดื่มคอมบูชา.....	5
2.1.3 วัตถุดิบ และวิธีการผลิตคอมบูชา.....	5
2.1.4 การทำงานของเชื้อจุลินทรีย์ในกระบวนการหมัก.....	6
2.1.4.1 แบคทีเรีย.....	7
2.1.4.2 ยีสต์.....	7
2.1.5 บทบาทของจุลินทรีย์ในการเกิดสารสำคัญในกระบวนการหมัก.....	8
2.1.6 ประโยชน์ของเครื่องดื่มคอมบูชา.....	10
2.2 เชื้อแบคทีเรีย <i>Acetobacter pasteurianus</i> .....	13
2.2.1 ลักษณะของเชื้อแบคทีเรีย <i>A. pasteurianus</i> .....	13
2.2.2 ปฏิกริยาการออกซิเดชันแอลกอฮอล์ เพื่อผลิตกรดอะซิติก.....	13
2.2.3 ความทนกรดอะซิติก.....	14
2.3 เชื้อยีสต์ <i>Zygosaccharomyces bailii</i> .....	14
2.3.1 ลักษณะของเชื้อยีสต์ <i>Z. bailii</i> .....	14
2.3.2 กระบวนการสร้างเอทานอล.....	15
2.3.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างเอทานอล.....	15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.4 ชา (Tea) .....	16
2.4.1 แหล่งกำเนิดชา.....	16
2.4.2 อนุกรมวิธาน และข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ของชา.....	17
2.4.3 กระบวนการผลิตชา.....	17
2.4.4 ชาดำ (Black Tea).....	18
2.4.5 ข้อมูลทางเภสัชวิทยา และคุณสมบัติในการรักษาโรค.....	19
2.5 กระเจี๊ยบแดง (Roselle).....	20
2.5.1 แหล่งกำเนิด.....	21
2.5.2 อนุกรมวิธาน และข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ของกระเจี๊ยบ.....	21
2.5.3 พฤกษเคมีของกระเจี๊ยบแดง.....	22
2.5.4 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในกระเจี๊ยบ.....	22
2.5.5 การใช้งานกระเจี๊ยบแดง.....	24
2.6 สารอนุมูลอิสระ และสารต้านอนุมูลอิสระ.....	24
2.6.1 สารอนุมูลอิสระ (Free radical).....	24
2.6.2 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant).....	25
2.6.2.1 การทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ.....	25
2.6.2.2 สารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติ (Natural antioxidant).....	26
2.6.3 ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Total Antioxidant Capacity).....	29
2.7 การทำแห้ง (Drying).....	30
2.7.1 หลักการ Freeze drying.....	31
2.7.2 ปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพผลิตภัณฑ์สุดท้ายและสารสำคัญในผลิตภัณฑ์.....	32
2.7.3 ข้อดีและข้อเสียของกระบวนการทำแห้งแบบ freeze drying.....	34
2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
<b>บทที่ 3</b> วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	38
3.1 วัตถุประสงค์ อุปกรณ์ และสารเคมี.....	38
3.1.1 วัตถุประสงค์.....	38
3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์.....	38
3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี.....	38
3.1.3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	38
3.1.3.2 สารเคมี.....	38
3.1.4 เครื่องมือและอุปกรณ์.....	39
3.2 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย.....	41
3.2.1 การเตรียมวัตถุประสงค์.....	41
3.2.2 ศึกษาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นในหัวเชื้อทางการค้า.....	41
3.2.3 ศึกษาความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสง (Optical Density) กับปริมาณเซลล์ของเชื้อ <i>Acetobacter pasteurianus</i> AJ605 และ <i>Zygosaccharomyces bailii</i> YN403 เพื่อเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น.....	41
3.2.4 ศึกษาการเจริญของเชื้อ <i>A. pasteurianus</i> AJ605 และ <i>Z. bailii</i> YN403 (Growth curve) ในอาหารชาดำหวาน.....	42
3.2.5 ศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของเชื้อ <i>A. pasteurianus</i> AJ605 และ <i>Z. bailii</i> YN403 สำหรับการหมักคอมบูชา.....	42
3.2.5.1 การเตรียมหัวเชื้อ <i>A. pasteurianus</i> AJ605 และ <i>Z. bailii</i> YN403.....	42
3.2.5.2 การหมักคอมบูชา.....	42
3.2.6 ศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างชาดำ และกระเจี๊ยบแดง สำหรับการหมักคอมบูชา.....	43
3.2.6.1 การเตรียมหัวเชื้อบริสุทธิ์.....	43
3.2.6.2 การหมักคอมบูชา.....	43
3.2.7 การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ของคอมบูชาในระหว่างกระบวนการหมัก.....	43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.2.7.1 ค่าพีเอช โดยใช้เครื่อง pH Meter.....	44
3.2.7.2 ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติก.....	45
3.2.7.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total Sugar) ด้วยวิธีฟีนอล-ซัลฟูริก (Phenol -Sulphuric).....	46
3.2.7.4 การวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ โดยใช้เครื่อง Gas – Chromatograph (GC).....	46
3.2.7.5 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu method.....	47
3.2.7.6 การวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ด้วยวิธี Crystalline Aluminum Chloride assay.....	48
3.2.7.7 การวิเคราะห์ปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมด ด้วยวิธี pH Differential.....	49
3.2.7.8 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging.....	49
3.2.7.9 ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC).....	51
3.2.8 การวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์ในระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชา..	52
3.2.9 ศึกษาปริมาณมอลโตเด็กซ์ทรินที่เหมาะสมในการทำผงแห้ง ของเครื่องดื่มคอมบูชา.....	53
3.2.10 การคำนวณค่าความสามารถในการรักษาสารประกอบชีวภาพ.....	53
3.2.11 การทดสอบทางประสาทสัมผัส.....	53
3.2.12 การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	54
<b>บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล.....</b>	<b>55</b>
4.1 ผลการศึกษาปริมาณแบคทีเรียอะซิติกและยีสต์ทั้งหมดในหัวเชื้อ คอมบูชาทางการค้า.....	55
4.2 ผลการศึกษาความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสง (Optical density) กับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์.....	55

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.3 การเจริญของเชื้อ <i>Acetobacter pasteurianus</i> AJ605 และ <i>Zygosaccharomyces bailii</i> YN403 ในชาดำหวาน.....	55
4.4 ผลการศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของเชื้อ <i>A. pasteurianus</i> AJ605 และ <i>Z. bailii</i> YN403 ในการหมักคอมบูชา.....	56
4.4.1 การเปลี่ยนแปลงของเชื้อ <i>A. pasteurianus</i> AJ605 และ <i>Z. bailii</i> YN403 ในระหว่างกระบวนการหมัก.....	56
4.4.2 ผลการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางเคมีระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชา ด้วยอัตราส่วนเชื้อที่แตกต่างกัน.....	60
4.4.2.1 ค่าพีเอช และปริมาณกรดทั้งหมด.....	60
4.4.2.2 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณแอลกอฮอล์.....	63
4.4.3 สารออกฤทธิ์ชีวภาพและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของคอมบูชา ในระหว่างกระบวนการหมัก.....	66
4.4.3.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณสารประกอบ ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด.....	66
4.4.3.2 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS.....	69
4.5 การปรับปรุงคุณภาพของคอมบูชาจากชาดำด้วยกระเจี๊ยบแดง ในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน.....	72
4.5.1 คุณภาพทางเคมีของคอมบูชาในระหว่างกระบวนการหมัก.....	73
4.5.1.1 ค่าพีเอช และปริมาณกรดทั้งหมด.....	73
4.5.1.2 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณแอลกอฮอล์.....	75
4.5.2 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของคอมบูชาในระหว่าง กระบวนการหมักชาดำผสมกระเจี๊ยบ.....	78
4.5.2.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมด.....	78
4.5.2.2 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS.....	82
4.6 ผลของปริมาณมอลต์เด็กซ์ทรินในการทำผงแห้งของคอมบูชาด้วยวิธีทำแห้ง แบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dry).....	85

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.6.1 คุณภาพทางเคมีและภาพของคอมบูซาก่อนและหลังกระบวนการ ทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง รวมทั้งปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ภายหลัง กระบวนการทำแห้ง.....	85
4.6.2 ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของคอมบูซาก่อนและหลังกระบวนการ ทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง.....	87
4.7 ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัส.....	91
4.7.1 ด้านความใส.....	91
4.7.2 ด้านสี.....	92
4.7.3 ด้านกลิ่น.....	92
4.7.4 ด้านรสชาติ.....	92
4.7.5 ความชอบโดยรวม.....	93
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	94
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	94
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	95
เอกสารอ้างอิง.....	96
ภาคผนวก.....	109
ภาคผนวก ก.....	110
ภาคผนวก ข.....	112
ภาคผนวก ค.....	114
ภาคผนวก ง.....	126

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 องค์ประกอบทางโภชนาการของกระเจี๊ยบแดง.....	22
3.1 อัตราส่วนของปริมาณเชื้อ <i>A. pasteurianus</i> AJ605 และ <i>Z. bailii</i> YN403 (ร้อยละโดยปริมาตร) ในกระบวนการหมักคอมบูชา.....	43
3.2 อัตราส่วนของชาดำและกระเจี๊ยบแดงที่ใช้เป็นวัตถุดิบในกระบวนการหมักคอมบูชา.....	44
4.1 แสดงการเปลี่ยนแปลงของเชื้อแบคทีเรีย <i>A. pasteurianus</i> AJ605 ระหว่าง กระบวนการหมักคอมบูชาจากชาดำ หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน.....	57
4.2 แสดงการเปลี่ยนแปลงของเชื้อยีสต์ <i>Z. bailii</i> YN403 ระหว่างกระบวนการหมัก คอมบูชาจากชาดำ หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน.....	58
4.3 ค่าพีเอชในคอมบูชาจากชาดำหมักด้วยเชื้อ <i>A. pasteurianus</i> AJ605 และ <i>Z. bailii</i> YN403 อัตราส่วนที่แตกต่างกัน หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน.....	61
4.4 ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร) ของคอมบูชาจากชาดำหมักด้วยเชื้อ <i>A. pasteurianus</i> AJ605 และ <i>Z. bailii</i> YN403 อัตราส่วนที่แตกต่างกัน หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน.....	62
4.5 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร) ในคอมบูชาจากชาดำหมักด้วยเชื้อ <i>A. pasteurianus</i> AJ605 และ <i>Z. bailii</i> YN403 อัตราส่วนที่แตกต่างกัน หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน.....	64
4.6 ปริมาณแอลกอฮอล์ (กรัมต่อลิตร) ในคอมบูชาจากชาดำหมักด้วยเชื้อ <i>A. pasteurianus</i> AJ605 และ <i>Z. bailii</i> YN403 อัตราส่วนที่แตกต่างกัน หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน.....	65
4.7 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (ไมโครกรัมสมมูลแกลลิกต่อมิลลิลิตร) ในคอมบูชาจากชาดำหมักด้วยเชื้อ <i>A. pasteurianus</i> AJ605 และ <i>Z. bailii</i> YN403 อัตราส่วนที่แตกต่างกัน หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน.....	67
4.8 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (ไมโครกรัมสมมูลเคอเวอซิทินต่อมิลลิลิตร) ในคอมบูชา จากชาดำหมักด้วยเชื้อ <i>A. pasteurianus</i> AJ605 และ <i>Z. bailii</i> YN403 อัตราส่วน ที่แตกต่างกัน หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน.....	68

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.9 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (มิลลิกรัมสมมูลกรดแอสคอร์บิกต่อมิลลิลิตร) ของคอมบูชาจากชาดำหมักด้วยเชื้อ <i>A. pasteurianus</i> AJ605 และ <i>Z. bailii</i> YN403 อัตราส่วนที่แตกต่างกัน หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน.....	70
4.10 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS (มิลลิกรัมโทรลอคซ์ต่อมิลลิลิตร) ของคอมบูชาจากชาดำหมักด้วยเชื้อ <i>A. pasteurianus</i> AJ605 และ <i>Z. bailii</i> YN403 อัตราส่วนต่างๆ.....	71
4.11 ค่าพีเอชในคอมบูชาจากชาดำ ชาดำผสมกระเจี๊ยบอัตราส่วนต่างๆ และคอมบูชาจากกระเจี๊ยบ.....	73
4.12 ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติค (กรัมต่อลิตร) ของคอมบูชาจากชาดำ ชาดำผสมกระเจี๊ยบ และคอมบูชาจากกระเจี๊ยบ หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน.....	74
4.13 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร) ของคอมบูชาจากชาดำ ชาดำผสมกระเจี๊ยบ และคอมบูชาจากกระเจี๊ยบ หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน.....	76
4.14 ปริมาณแอลกอฮอล์ (กรัมต่อลิตร) ของคอมบูชาจากชาดำ ชาดำผสมกระเจี๊ยบ และคอมบูชาจากกระเจี๊ยบ หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน.....	77
4.15 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (ไมโครกรัมสมมูลแกลลิกต่อมิลลิลิตร) ของคอมบูชาจากชาดำ ชาดำผสมกระเจี๊ยบ และคอมบูชาจากกระเจี๊ยบ หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน.....	79
4.16 ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (ไมโครกรัมสมมูลเคอเวอซิทินต่อมิลลิลิตร) ของคอมบูชาจากชาดำ ชาดำผสมกระเจี๊ยบ และคอมบูชาจากกระเจี๊ยบ หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน.....	80
4.17 ปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมด (มิลลิกรัมสมมูลไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ต่อมิลลิลิตร) ของคอมบูชาจากชาดำ ชาดำผสมกระเจี๊ยบ และคอมบูชาจากกระเจี๊ยบ หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน.....	81
4.18 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (มิลลิกรัมสมมูลแอสคอร์บิกต่อมิลลิลิตร) ของคอมบูชาจากชาดำ ชาดำผสมกระเจี๊ยบ และคอมบูชาจากกระเจี๊ยบ หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน.....	83

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.19 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS (มิลลิกรัมสมมูลโทรลอกซ์ต่อมิลลิลิตร) ของคอมบูชาจากชาดำ ชาดำผสมกระเจี๊ยบ และคอมบูชาจากกระเจี๊ยบหมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน.....	84
4.20 ลักษณะทางเคมีของคอมบูชาจากชาดำผสมกระเจี๊ยบอัตราส่วน 8 ต่อ 2 หมักด้วยเชื้อ <i>A. pasteurianus</i> AJ605 และ <i>Z. bailii</i> YN403 อัตราส่วน 8 ต่อ 2 เป็นเวลา 10 วัน ก่อนและหลังทำแห้งด้วยวิธีทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dried).....	86
4.21 ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total plate count) และเชื้อ <i>Esherichia coli</i> และ Coliform ในตัวอย่างผงคอมบูชาที่ผสมมอลโตเดกซ์ทรินปริมาณที่แตกต่างกัน.....	87
4.22 ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของคอมบูชาจากชาดำผสมกระเจี๊ยบผสมกับสารมอลโตเดกซ์ทรินก่อนและหลังการทำผงแห้ง.....	90
4.23 ผลคะแนนการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของเครื่องดื่มคอมบูชา.....	91

## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 ลักษณะการหมักคอมบูชา.....	4
2.2 วิธีการทำงานร่วมกันระหว่างเชื้อแบคทีเรีย <i>A. xylinum</i> และเชื้อยีสต์ <i>Zygosaccharomyces</i> sp. ....	8
2.3 การเปลี่ยนแปลงของสารประกอบชีวภาพสำคัญในซาระหว่างกระบวนการออกซิเดทีฟ.... (กระบวนการหมัก)	9
2.4 การปลูกต้นชาเพื่อเก็บเกี่ยวในประเทศอินเดีย.....	18
2.5 ลักษณะของต้นกระเจี๊ยบและกลีบเลี้ยงของดอกกระเจี๊ยบ.....	21
2.6 ปฏิกริยาการขจัดอนุมูลอิสระ ABTS <sup>•+</sup> .....	30
2.7 ปฏิกริยาการขจัดอนุมูลอิสระ DPPH <sup>•</sup> .....	30
4.1 ลักษณะการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย <i>A. pasteurianus</i> AJ605 และเชื้อยีสต์ <i>Z. bailii</i> ..... YN403 ในอาหารชาดำหวาน	56
4.2 การเปลี่ยนแปลงของเชื้อแบคทีเรีย <i>A. pasteurianus</i> AJ605 (B) และเชื้อยีสต์ <i>Z. bailii</i> YN403 (Y) ระหว่างกระบวนการหมักในอาหารชาดำหวาน ก) B10Y0: ชุดการทดลองที่ใช้.....	59
4.3 ค่าพีเอชในคอมบูชาจากชาดำหมักด้วยเชื้อ <i>A. pasteurianus</i> AJ605 และ <i>Z. bailii</i> YN403 อัตราส่วนที่แตกต่างกัน หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน.....	61
4.4 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร) ระหว่างกระบวนการหมักในอาหารชาดำหวานที่เติมเชื้อแบคทีเรีย <i>A. pasteurianus</i> AJ605 และ เชื้อยีสต์ <i>Z. bailii</i> YN403 อัตราส่วนที่แตกต่างกัน หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน.....	62
4.5 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร) ระหว่างกระบวนการหมัก ในอาหารชาดำหวานที่เติมเชื้อแบคทีเรีย <i>A. pasteurianus</i> AJ605 และ เชื้อยีสต์ <i>Z. bailii</i> YN403 อัตราส่วนที่แตกต่างกัน.....	64
4.6 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอลกอฮอล์ (กรัมต่อลิตร) ระหว่างกระบวนการหมัก ในอาหารชาดำหวานที่เติมเชื้อแบคทีเรีย <i>A. pasteurianus</i> AJ605 และ เชื้อยีสต์ <i>Z. bailii</i> YN403 อัตราส่วนที่แตกต่างกัน.....	65

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.7 การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (ไมโครกรัมสมมูลแกลลิกต่อมิลลิลิตร) ระหว่างกระบวนการหมักในอาหารชาดำหวานที่เติมเชื้อแบคทีเรีย <i>A. pasteurianus</i> AJ605 และ เชื้อยีสต์ <i>Z. bailii</i> YN403 อัตราส่วนที่แตกต่างกัน.....	67
4.8 การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (ไมโครกรัมสมมูลเคอเวอซิทินต่อมิลลิลิตร) ระหว่างกระบวนการหมักในอาหารชาดำหวานที่เติมหัวเชื้อแบคทีเรีย <i>A. pasteurianus</i> AJ605 และ เชื้อยีสต์ <i>Z. bailii</i> YN403 อัตราส่วนที่แตกต่างกัน.....	69
4.9 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (มิลลิกรัมแอสคอร์บิกต่อมิลลิลิตร) ของคอมบูชาจากชาดำหมักด้วยเชื้อ <i>A. pasteurianus</i> AJ605 และ <i>Z. bailii</i> YN403 อัตราส่วนที่แตกต่างกัน.....	71
4.10 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS (มิลลิกรัมโทรลอคซ์ต่อมิลลิลิตร) ของคอมบูชาจากชาดำหมักด้วยเชื้อ <i>A. pasteurianus</i> AJ605 และ <i>Z. bailii</i> YN403 อัตราส่วนที่แตกต่างกัน.....	72
4.11 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในคอมบูชาจากชาดำ ชาดำผสมกระเจี๊ยบ และคอมบูชาจากกระเจี๊ยบ หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน.....	73
4.12 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร) ระหว่างกระบวนการหมักในคอมบูชาจากชาดำ ชาดำผสมกระเจี๊ยบ และคอมบูชาจากกระเจี๊ยบ หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน.....	75
4.13 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร) ระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชาจากชาดำ ชาดำผสมกระเจี๊ยบ และคอมบูชาจากกระเจี๊ยบ.....	76
4.14 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอลกอฮอล์ (กรัมต่อลิตร) ระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชาจากชาดำ ชาดำผสมกระเจี๊ยบ และคอมบูชาจากกระเจี๊ยบ.....	77
4.15 การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (ไมโครกรัมสมมูลแกลลิกต่อมิลลิลิตร) ระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชาจากชาดำ ชาดำผสมกระเจี๊ยบ และคอมบูชาจากกระเจี๊ยบ.....	79

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.16	การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (ไมโครกรัมสมมูล เคอควิทินต่อมิลลิลิตร) ระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชาจากชาดำ ชาดำผสมกระเจี๊ยบ และคอมบูชาจากกระเจี๊ยบ.....	80
4.17	การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมด (มิลลิกรัมสมมูลไซยานิดิน- 3-กลูโคไซด์ต่อมิลลิลิตร) ระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชาจากชาดำ ชาดำผสมกระเจี๊ยบ และคอมบูชาจากกระเจี๊ยบ.....	81
4.18	การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของคอมบูชาที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ร้อยละ 50 (IC <sub>50</sub> ) (มิลลิกรัมสมมูลกรดแอสคอร์บิกต่อมิลลิลิตร) ระหว่างกระบวนการ หมักคอมบูชาจากชาดำ ชาดำผสมกระเจี๊ยบ และคอมบูชาจากกระเจี๊ยบ.....	83
4.19	การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของคอมบูชาที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ร้อยละ 50 (IC <sub>50</sub> ) (มิลลิกรัมสมมูลโทรลอกซ์ต่อมิลลิลิตร) ระหว่าง กระบวนการหมักคอมบูชาจากชาดำ ชาดำผสมกระเจี๊ยบ และคอมบูชาจากกระเจี๊ยบ.....	84
4.20	คะแนนการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของคอมบูชาจากชาดำ คอมบูชาจากชาดำผสมกระเจี๊ยบ และผงคอมบูชาจากชาดำผสมกระเจี๊ยบ.....	92

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันผู้บริโภคสนใจเลือกรับประทานอาหารและเครื่องดื่มที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพเพิ่มขึ้น คอมบูชาจัดเป็นเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ ซึ่งเกิดจากการนำน้ำชาผสมกับน้ำตาลและหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์ ทำให้ได้เครื่องดื่มที่มีรสชาติหวาน และมีความเปรี้ยวจากกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ มีแอลกอฮอล์เล็กน้อยที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น กระบวนการหมักคอมบูชาจะเป็นการทำงานร่วมกันของเชื้อแบคทีเรียอะซิติก เช่น *Komagataibacter xylinum*, *Gluconacetobacter hansenii* และเชื้อยีสต์ เช่น *Saccharomyces* sp., *Schizosaccharomyces pombe*, *Zygosaccharomyces kombuchensis* (Villarreal-Soto *et al.*, 2019) คอมบูชามีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ลดภาวะเครียดจากการออกซิเดชัน นอกจากนี้คอมบูชายังมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ (Kaewkod *et al.*, 2019) ลดความเสี่ยงในการเกิดโรคเบาหวาน ลดปริมาณคอเลสเตอรอลและระดับไขมันไตรกลีเซอไรด์ (Cardoso *et al.*, 2020)

การหมักคอมบูชานิยมใช้หัวเชื้อคอมบูชาทางการค้า ซึ่งมีชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์มากมายที่ไม่สามารถระบุสายพันธุ์และปริมาณได้แน่ชัด ส่งผลให้คุณภาพคอมบูชาที่ได้ไม่คงที่และอาจมีจุลินทรีย์ก่อโรคปนเปื้อนได้ จุลินทรีย์เป็นหนึ่งในปัจจัยสำคัญในการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบชีวภาพ และคุณสมบัติทางเคมีชีวภาพระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชา (Chakravorty *et al.*, 2016) เช่น ปริมาณกรดกลูคูโรนิกที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย มีปริมาณสูงขึ้นในคอมบูชาที่หมักด้วยเชื้อที่แยกได้ และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่เพิ่มขึ้น (Nguyen *et al.*, 2015 ; Malbasä *et al.*, 2011)

ชาดำ (Black Tea) เป็นเครื่องดื่มที่มีการบริโภคมายาวนาน และเป็นที่ยอมรับในหลายพื้นที่ทั่วโลก ประกอบด้วยสารประกอบชีวภาพหลายชนิด เช่น โพลีฟีนอล ฟลาโวนอยด์ กรดฟีนอลิก กรดอะมิโน และวิตามิน (Naveed *et al.*, 2018) การบริโภคชาดำมีส่วนช่วยป้องกันโรคท้องเสีย ลดไขมันในเลือด ลดคอเลสเตอรอล รวมถึงช่วยต้านอนุมูลอิสระในร่างกาย (Naveed *et al.*, 2018 ; Zhao *et al.*, 2019) โพลีฟีนอลจะถูกลดด้วยเอนไซม์และเกิดเป็นสารประกอบทางชีวภาพขึ้น เช่น สารกลุ่มทีฟลาวิน (Theflavins) ซึ่งจะส่งผลต่อรสชาติที่เฉพาะตัวของชาดำ (Zhang *et al.*, 2019) สารประกอบชีวภาพในชาดำมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคหลายชนิด เช่น *Streptococcus mutants* (Naderi *et al.*, 2011) *Bacillus cereus* แบคทีเรียก่อโรคในอาหารกลุ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Facultative anaerobe (Friedman *et al.*, 2006) สำหรับกระเจี๊ยบแดง (*Hibiscus sabdariffa* L.) ส่วนที่นำมาใช้บริโภคคือ ส่วนของกลีบเลี้ยง (Calyxes) ซึ่งมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น แอนโทไซยานิน ฟลาโวนอยด์ (Maciel *et al.*, 2018) สารในกลุ่มโพลีฟีนอล ฟลาโวนอล ทำให้กระเจี๊ยบมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเซลล์มะเร็งได้

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์คอมบูชาให้มีคุณภาพสม่ำเสมอ ลดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ ด้วยการใช้จุลินทรีย์ที่แยกได้จากกระบวนการหมักคอมบูชาก่อนหน้านี้ และมีการใช้ชาดำร่วมกับกระเจี๊ยบในอัตราส่วนต่างๆ ในกระบวนการหมัก เพื่อหาอัตราส่วนที่เหมาะสมมาผลิตเป็นคอมบูชาที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูง และผลิตคอมบูชาในลักษณะผงแห้งสำหรับขงดื่มตอบสนองการใช้ชีวิตของผู้บริโภคในปัจจุบัน เพิ่มความสะดวกในการพกพา การเก็บรักษาและการขนส่ง ซึ่งสามารถขยายการผลิตลงสู่ระดับชุมชนหรืออุตสาหกรรมได้

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. ศึกษาศักยภาพในการนำ ชาดำ กระเจี๊ยบแดง และชาดำผสมกระเจี๊ยบแดงมาใช้เป็นวัตถุดิบในการหมักคอมบูชา
2. พัฒนากระบวนการหมักคอมบูชาโดยใช้จุลินทรีย์ที่แยกได้จากกระบวนการหมัก เปรียบเทียบกับการใช้หัวเชื้อดั้งเดิมหรือหัวเชื้อทางการค้า มีการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเคมี ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และทดสอบทางประสาทสัมผัสระหว่างกระบวนการหมัก
3. ศึกษาปริมาณมอลโตเด็กซ์ทรินที่เหมาะสมในการทำแห้งด้วยวิธี Freeze dry ของเครื่องดื่มคอมบูชาที่ผลิตได้จากการใช้เชื้อบริสุทธิ์ และศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ ทางเคมี และทางจุลินทรีย์ของผลิตภัณฑ์ที่ได้ รวมทั้งทดสอบทางประสาทสัมผัส เพื่อดูการยอมรับของผู้บริโภค

## 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

หมักคอมบูชาด้วยชาดำ ชาดำร่วมกับกระเจี๊ยบแดง และกระเจี๊ยบแดงด้วยการใช้เชื้อบริสุทธิ์ของเชื้อยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกที่แยกได้จากกระบวนการหมักคอมบูชาในอัตราส่วนของเชื้อที่แตกต่างกัน หมักเป็นเวลา 10 วัน เก็บตัวอย่างในวันที่ 0 3 7 และ 10 วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของเชื้อจุลินทรีย์ พีเอช ปริมาณกรดทั้งหมด (ร้อยละกรดอะซิติก) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณแอลกอฮอล์ ปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS รวมทั้งทดสอบการยอมรับของผู้บริโภค จากนั้นคัดเลือกอัตราส่วนของเชื้อผสมที่เหมาะสม ที่ทำให้คอมบูชามีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูง และรสชาติเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค นำมาทำผงคอมบูชาแห้งด้วยวิธีการ Freeze drying ศึกษาปริมาณสารมอลโตเด็กซ์ทรินที่เหมาะสมผสมในคอมบูชา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นศึกษาคุณภาพทางกายภาพ เคมี และจุลินทรีย์ รวมทั้งทดสอบทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์คอมบูชาในลักษณะผงแห้ง

#### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถผลิตเครื่องดื่มคอมบูชาจากชาดำผสมกระเจี๊ยบแดงโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จากกระบวนการหมักคอมบูชา
2. สามารถควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มคอมบูชาให้มีคุณภาพที่สม่ำเสมอในการผลิตทุกครั้ง
3. ผลิตภัณฑ์คอมบูชาที่มีรสชาติแตกต่างจากเดิม และเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2

# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

## 2.1 คอมบูชา (Kombucha)

### 2.1.1 ลักษณะของคอมบูชา

คอมบูชา เป็นชื่อสามัญของน้ำชาผสมน้ำตาลที่หมักด้วยเชื้อแบคทีเรียอะซิติกร่วมกับเชื้อกลุ่มออสโมฟิลิกยีสต์ มีรสชาติหวานเล็กน้อย และมีรสชาติเปรี้ยวจากกรดอะซิติก (Kumar and Joshi, 2016) ถูกจัดว่าเป็นเครื่องดื่มทางเลือกเพื่อสุขภาพ (Functional Beverage) ผลิตด้วยกระบวนการหมักโดยเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ (Villarreal-Soto *et al.*, 2018) การผลิตคอมบูชาเตรียมโดยเติมหัวเชื้อลงในน้ำชาผสมน้ำตาลเพื่อให้เกิดการหมัก วัตถุดิบที่ใช้ผลิตที่พบได้ในการทำคอมบูชาทั่วไปคือชาดำ เพิ่มความหวานด้วยน้ำตาลซูโครส ผลผลิตที่ได้จากกระบวนการหมักจะแบ่งเป็น 2 ส่วน คือแผ่นเซลล์ูลอส (Tea fungus) ที่ลอยอยู่ผิวหน้า และส่วนของน้ำชาหมัก (Fermented tea broth) โดยจะพบเชื้อแบคทีเรียและยีสต์อยู่ทั้งส่วนแผ่นเซลล์ูลอสและส่วนของน้ำชาหมักด้านล่าง ดังแสดงในรูปที่ 2.1 คอมบูชามีสารประกอบหลักคือ กรดอะซิติก และเอทานอล ซึ่งเกิดขึ้นภายหลังกระบวนการหมักเป็นเวลา 7-10 วัน จะได้เครื่องดื่มที่มีความซ่า รสชาติเปรี้ยวเล็กน้อย ให้ความรู้สึกสดชื่น และประกอบด้วยกรดหลายชนิด กรดอะมิโน วิตามิน และเอนไซม์ต่างๆ ส่งผลให้คอมบูชามีสารที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพและมีสรรพคุณทางยาด้วย คอมบูชาสามารถทำบริโภคเองได้ที่บ้านทำให้ความนิยมของคอมบูชามีการกระจายออกเป็นวงกว้างเหมือนกับเครื่องดื่มดั้งเดิมชนิดอื่นๆ (Jayabalan *et al.*, 2014 ; Villarreal-Soto *et al.*, 2018.)



### รูปที่ 2.1 ลักษณะการหมักคอมบูชา

ที่มา : <https://www.news-medical.net/life-sciences/Microbiology-of-Kombucha.aspx> สืบค้นวันที่ 8 พฤษภาคม 2563)

### 2.1.2 ประวัติที่มาของเครื่องดื่มคอมบูชา

มีการนำคอมบูชาไปใช้รักษาโรคในเอเชียตะวันออก คอมบูชามีต้นกำเนิดจากตอนเหนือของจีน (แมนจูเรีย) โดยในสมัยราชวงศ์ฉิน (220 ปีก่อนคริสตกาล) นำไปใช้สำหรับการล้างพิษและให้พลังงาน เมื่อเส้นทางการค้าขยายมากขึ้น มีการพบข้อมูลว่าคอมบูชา (ชื่อทางการค้า Mo-Gu โมกุ) แพร่ขยายไปที่รัสเซีย (เรียกว่า Cainiigrib, Cainii kvass, Japonskigrib, kombucha, Jsakvasska) หลังจากนั้นราวศตวรรษที่ 20 จึงได้มีการเผยแพร่ไปยังยุโรปตะวันออก ดังเช่นปรากฏที่ประเทศเยอรมัน (เรียกว่า Heldenpilz, Kombuchaschwamm) พฤติกรรมการดื่มชาหมักเริ่มมีการยอมรับในยุโรปตั้งแต่ช่วงสงครามโลกครั้งที่ 2 และในปี ค.ศ. 1960 นักวิทยาศาสตร์ประเทศสวีเดนออกแถลงการณ์ว่า การดื่มคอมบูชาให้ประโยชน์คล้ายคลึงกับการรับประทานโยเกิร์ต และมีแนวโน้มนิยมบริโภคคอมบูชามากขึ้น ปัจจุบันคอมบูชามีวางจำหน่ายในร้านค้าทั่วไปและมีหลากหลายรสชาติ อีกทั้งหิวซื้อยังมีจำหน่ายตามเว็บไซต์ออนไลน์ (Jayabalan *et al.*, 2014)

### 2.1.3 วัตถุดิบและวิธีการผลิตคอมบูชา

การผลิตคอมบูชาวัตถุดิบที่ใช้หลักจะเป็นชาดำซึ่งมีสารประกอบอินทรีย์ที่มีประโยชน์หลายชนิด เติมน้ำตาลซูโครสเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนให้กับเชื้อจุลินทรีย์ และเป็นสารให้ความหวานสำหรับคอมบูชาด้วย มีการเติมแผ่นเซลล์ูโลสและส่วนของน้ำหมักจากหัวเชื้อเดิม (Mother culture) ซึ่งประกอบไปด้วยเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ (Consortium) ลงในน้ำชาเพื่อให้เกิดการหมัก และยังส่งผลให้คอมบูชามีค่าความเป็นกรด-เบสลดลง ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ (Chan *et al.*, 2006 ; Jayabalan *et al.*, 2014 ; John *et al.*, 2014 ; Zhang *et al.*, 2019) ปิดฝาภาชนะด้วยผ้าสะอาดเพื่อกันแมลงแล้วนำไปวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อผ่านไป 2-3 วัน แผ่นเซลล์ูโลสจะเริ่มสร้างและลอยอยู่บริเวณผิวหน้าของชาหมักลักษณะเป็นแผ่นเจลบางๆ ซึ่งจะกลายเป็นหัวเชื้อ เซลล์ูโลสใหม่ที่สร้างบนแผ่นหัวเชื้อเดิมที่ได้ทำการเติมลงไปในตอนเริ่มแรกของการหมัก ชาหมักจะเริ่มมีกลิ่นเฉพาะและมีฟองแก๊สที่เกิดจากการเปลี่ยนกรดคาร์บอนิกระหว่างกระบวนการหมัก หลังจากผ่านไป 10-14 วันแผ่นหัวเชื้อเซลล์ูโลสจะสร้างสมบูรณ์ที่ผิวหน้าของน้ำชาหมัก มีลักษณะเป็นแผ่นหนา แผ่นปิดคลุมผิวหน้าของชาหมัก เมื่อครบจำนวนวันของการหมักจะทำการแยกส่วนของแผ่นหัวเชื้อเซลล์ูโลสและน้ำชาหมักออกเก็บไว้ปริมาณเล็กน้อยสำหรับเป็นหัวเชื้อต่อไป ในส่วนของน้ำชาหมักที่เหลือนำไปกรองและเก็บใส่ขวดปิดฝาให้สนิทแช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Jayabalan *et al.*, 2014) ทั้งนี้ในแต่ละภูมิภาคจะมีการใช้ปริมาณของหัวเชื้อจุลินทรีย์ ชา ชนิดและปริมาณของน้ำตาล (แหล่งคาร์บอน) แตกต่างกันไป ซึ่งล้วนแต่มีผลต่อคุณภาพและลักษณะชาหมักที่ได้ (Amarasinghe *et al.*, 2018)

แผ่นหัวเชื้อเซลล์ูโลส (Tea fungus) ของแต่ละภูมิภาคหรือแต่ละพื้นที่จะมีความแตกต่างกันทั้งในแง่ของสายพันธุ์และปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่ประกอบอยู่ในหัวเชื้อ ซึ่งปัจจัยเหล่านี้ส่งผลถึงลักษณะองค์ประกอบทางเคมีของคอมบูชาที่ได้ (Chen *et al.*, 2000 ; Marsh *et al.*, 2014)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปัจจุบันเริ่มมีการปรับเปลี่ยนวัตถุดิบหลักจากชาดำเป็นวัตถุดิบชนิดอื่นเพื่อเพิ่มคุณประโยชน์ เพิ่มความหลากหลาย และลดต้นทุนในการผลิต เช่น Jayabalan *et al.*, (2007) ได้นำชาดำ ชาเขียว และกากชาที่เหลือทิ้งจากโรงงานมาใช้เป็นวัตถุดิบในการหมักคอมบูชา และทดสอบเปรียบเทียบ ปริมาณสารอินทรีย์ โปรตีน และการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของคอมบูชาที่ได้จากชาหมักทั้ง 3 ชนิด Fu *et al.*, (2013) นำชาเขียว ชาดำ และผงชาทำการหมักคอมบูชาและเปรียบเทียบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระระหว่างคอมบูชาจากวัตถุดิบทั้ง 3 ชนิด Velićanski *et al.*, (2014) ใช้ส่วนใบของต้นเลมอนบาล์ม ซึ่งเป็นพืชวงศ์เดียวกับสะระแหน่มาทำการทดสอบหมักคอมบูชาเปรียบเทียบกับคอมบูชาจากชาดำ มีการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ และเริ่มมีงานวิจัยทำการนำพืชชนิดอื่นมาผสมกับชาดำเพื่อเพิ่มสารประกอบที่มีประโยชน์ในผลิตภัณฑ์คอมบูชามากขึ้น เช่น Sun *et al.*, (2014) ได้นำชาดำมาผสมกับต้นอ่อนข้าวสาลีในอัตราส่วนต่างๆ พบว่าที่อัตราส่วนน้ำชาดำต่อน้ำต้นอ่อนข้าวสาลี 1 ต่อ 1 ร้อยละโดยปริมาตรให้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่สูงที่สุด

ในส่วนของแหล่งคาร์บอนมีรายงานการทดลองปรับเปลี่ยนชนิดของแหล่งคาร์บอนเพื่อหาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม มีองค์ประกอบสารอินทรีย์หลากหลาย และทำให้คอมบูชามีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูง Muhialdin *et al.*, (2018) รายงานว่าควรใช้น้ำตาลมะพร้าวในการหมักคอมบูชาเพื่อให้เครื่องดื่มมีประโยชน์ต่อสุขภาพสูงสุด น้ำตาลมะพร้าวและกากน้ำตาลเป็นทางเลือกที่น่าสนใจที่จะนำมาใช้ทดแทนน้ำตาลซูโครสซึ่งใช้อยู่เดิมในการหมักคอมบูชา

#### 2.1.4 การทำงานของเชื้อจุลินทรีย์ในกระบวนการหมัก

เชื้อในกลุ่มแบคทีเรียอะซิติก (Acetic acid bacteria : AAB) ที่พบในชาหมักส่วนใหญ่อยู่ในแฟมิลี Acetobacteraceae เช่น *Acetobacter xylinum* (Sievers *et al.*, 1995) และยังพบเชื้อแบคทีเรียในแฟมิลี Lactobacteriaceae อีกเล็กน้อย ในส่วนของเชื้อยีสต์ ส่วนใหญ่จะพบได้ในกระบวนการหมัก เช่น จีนิส *Dekkera* จีนิส *Hansenispora* และจีนิส *Zygosaccharomyces* (Coton *et al.*, 2017) โดยแบคทีเรียอะซิติกจะสร้างแผ่นเซลล์ulosolอยุ่บนผิวหน้าของน้ำหมัก อีกทั้งยังทำหน้าที่ในการสร้างกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ เช่น กรดอะซิติก (Acetic acid) กรดกลูโคนิก (Gluconic acid) กรดทาร์ทาริก (Tartaric acid) และกรดมาลิก (Malic acid) ซึ่งเป็นกรดที่พบได้มากในกระบวนการหมักคอมบูชา และพบว่าแบคทีเรียอะซิติกยังมีการผลิตกรดซิตริกบ้างในกระบวนการหมัก ความสามารถในการผลิตกรดนี้ส่งผลให้คอมบูชามีรสชาติเปรี้ยว (Villarreal-Soto *et al.*, 2018)

ในขณะที่เชื้อยีสต์ได้เปลี่ยนน้ำตาลซูโครสไปเป็นน้ำตาลฟรุกโตสและกลูโคสเพื่อเข้าสู่กระบวนการสร้างเอทานอล ซึ่งแบคทีเรียอะซิติกจะออกซิไดซ์เอทานอลให้เป็นกรดอะซิติกต่อไป มีรายงานว่าทั้งเอทานอลและกรดอะซิติกมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคและช่วยป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์อื่นในคอมบูชา (Dufresne and Farnworth, 2000) ซึ่งตลอดระยะเวลาเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เวลาของกระบวนการหมักพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ และส่งผลต่อสารที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมัก รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงทางเคมีด้วย (Chakravoty *et al.*, 2016)

#### 2.1.4.1 แบคทีเรีย

แบคทีเรียอะซิติกเป็นแบคทีเรียที่พบในหัวเชื้อคอมบูชา ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีการใช้อากาศ และสามารถออกซิไดซ์แอลกอฮอล์เป็นกรดอะซิติก แบคทีเรียชนิดนี้มีพฤติกรรมที่แตกต่างกับยีสต์คือ ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโตและใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึม โดยกระบวนการเมแทบอลิซึมนั้นจะเป็นการเปลี่ยนเอทานอนให้เป็นสารอะซีทัลดีไฮด์ (Acetaldehyde) และเปลี่ยนสารอะซีทัลดีไฮด์ไฮเดรต (Acetaldehyde hydrate) ให้เป็นกรดอะซิติก โดยใช้เอนไซม์อะซีทัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (Acetaldehyde dehydrogenase) (Villarreal-Soto *et al.*, 2018)

มีแบคทีเรียบางกลุ่มที่สามารถสร้างแผ่นเซลล์ได้ เช่น *Aerobacter*, *Azotobacter*, *Agrobacterium*, *Rhizobium* และ *Gluconacetobacter* ในส่วนของยีสต์ *Acetobacter* ที่มีเชื้อตัวสำคัญ เช่น *Acetobacter xylinum* ซึ่งมีการระบุชื่อใหม่เป็น *Gluconacetobacter xylinus* และปัจจุบันระบุเป็นชื่อ *Komagataeibacter xylinus* (Yamada *et al.*, 2012) กระบวนการทางชีวเคมีที่เกิดขึ้นโดยเซลล์แบคทีเรียจะสังเคราะห์สารยูริดีนไดฟอสโฟกลูโคส (Uridine diphosphoglucose : UDP-Glc) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์เซลล์ลอส ข้อดีของการผลิตเซลล์ลอสในลักษณะนี้คือเชื้อแบคทีเรียสามารถเจริญได้เร็ว และสามารถสร้างเซลล์ลอสจากแหล่งคาร์บอนหลากหลายชนิดไม่ว่าจะเป็น กลูโคส เอทานอล ซูโครส และกลีเซอรอล (Villarreal-Soto *et al.*, 2018)

#### 2.1.4.2 ยีสต์

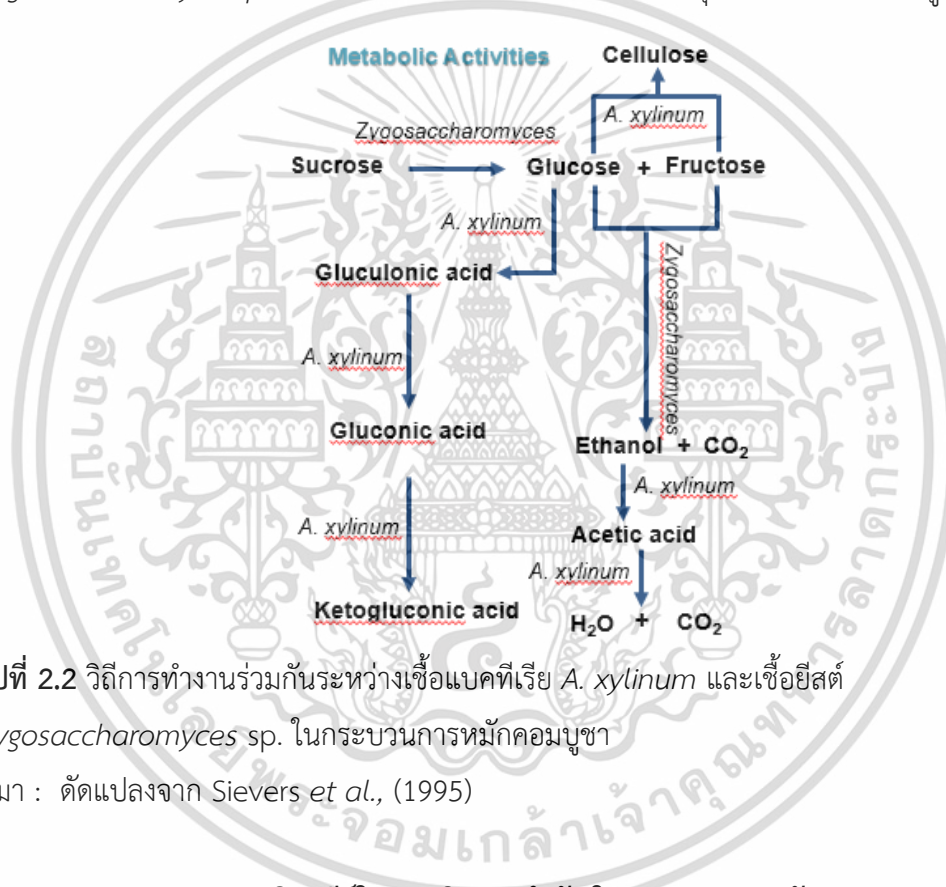
ในกระบวนการหมักคอมบูชา ยีสต์จะย่อยสลายน้ำตาลและผลิตเอทานอล ยีสต์ที่พบได้บ่อย เช่น *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งมีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลสูง ทั้งนี้ยีสต์สายพันธุ์อื่นๆ ในกลุ่ม non-*Saccharomyces* ก็ได้มีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมเพิ่มมากขึ้น เช่น ในการหมักไวน์ เตกิลลา (tequila) เป็นต้น เพื่อเพิ่มกลิ่นเฉพาะที่ซับซ้อนของผลิตภัณฑ์สุดท้าย การทำงานร่วมกันของยีสต์กับแบคทีเรียอะซิติกในหัวเชื้อคอมบูชาทำให้เกิดลักษณะที่ต้องการขึ้นในผลิตภัณฑ์คอมบูชา

มีรายงานสายพันธุ์ของยีสต์ที่พบในหัวเชื้อคอมบูชา เช่น ยีสต์ *Candida Zygosaccharomyces*, *Saccharomyces*, *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Torulasporea*, *Pichia*, *Brettanomyces/Dekkera*, *Lachancea*, *Saccharomycoides*, *Shizosaccharomyces* และ *Kluyveromyces* (Villarreal-Soto *et al.*, 2018)

March *et al.*, (2013) ได้ทำการตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์ในแผ่นเซลล์ลอสและส่วนน้ำหมักของหัวเชื้อคอมบูชาจากประเทศแคนาดา สหรัฐอเมริกา อังกฤษ และไอร์แลนด์ ในวันที่ 3 และ 10 ของการหมัก พบว่าแบคทีเรียที่พบส่วนใหญ่คือ *Gluconacetobacter* ซึ่งพบมากกว่าร้อยละ 80 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ละ 85 ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมด และพบยีสต์ *Acetobacter* อีกเล็กน้อยประมาณร้อยละ 2 ของตัวอย่าง มีการพบแบคทีเรียยีสต์ *Lactobacillus* ในตัวอย่างประมาณร้อยละ 30 ในส่วนของเชื้อยีสต์ส่วนใหญ่ที่พบคือ *Zygosaccharomyces* ร้อยละ 95 ของตัวอย่างส่วนน้ำหมัก และยังพบได้มากในแผ่นเซลล์โลสด้วย

Gaggia *et al.*, (2018) ศึกษาชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำหมักและแผ่นเซลล์โลสของคอมบูชาจากชาดำ ชาเขียว และคอมบูชาจากต้นรอยอิโบส (Rooibos) ในวันที่ 7 และ 14 ของกระบวนการหมัก โดยแบคทีเรียอะซิติกกลุ่มหลักที่พบอยู่ในยีสต์ *Komagataeibacter* spp. และ *Gluconobacter* spp. ยีสต์ที่พบมากที่สุดในตัวอย่างเป็น *Brettanomyces bruxellensis* และ *Zygosaccharomyces parabailli* ซึ่งการทำงานร่วมกันของเชื้อจุลินทรีย์แสดงได้ตามรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 วิธีการทำงานร่วมกันระหว่างเชื้อแบคทีเรีย *A. xylinum* และเชื้อยีสต์ *Zygosaccharomyces* sp. ในกระบวนการหมักคอมบูชา  
ที่มา : ดัดแปลงจาก Sievers *et al.*, (1995)

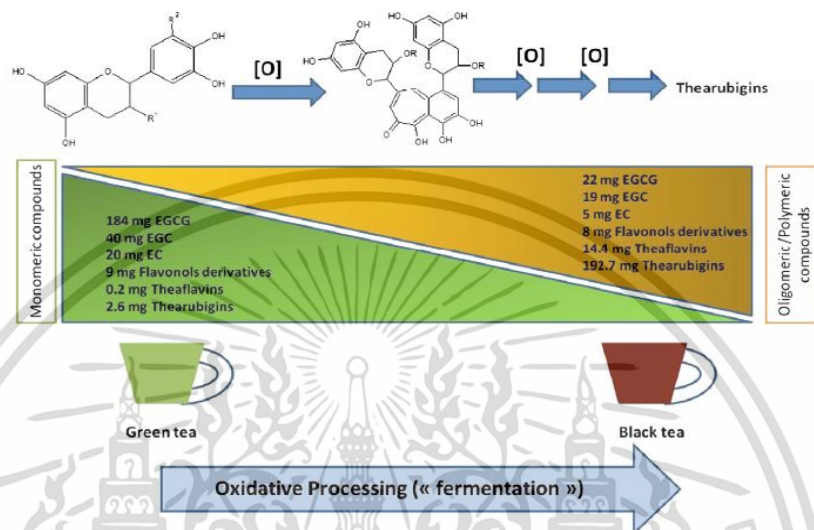
### 2.1.5 บทบาทของจุลินทรีย์ในการเกิดสารสำคัญในกระบวนการหมัก

สารประกอบที่ให้กลิ่นรสในคอมบูชาสามารถแบ่งเป็น 3 กลุ่ม ตามแหล่งที่มาของสารประกอบ คือ 1) องค์ประกอบในใบชาและอื่นๆ ที่เติมลงไป 2) น้ำตาล 3) ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการหมักของเชื้อจุลินทรีย์ระหว่างกระบวนการหมัก (Zhao *et al.*, 2018)

Zhao *et al.*, (2018) รายงานว่าสารโพลีฟีนอลในชาเป็นสารประกอบที่พบได้ในคอมบูชาตั้งแต่ยังไม่เกิดการหมัก ซึ่งสารกลุ่มนี้เป็นสารกลุ่มหลักที่ทำให้เกิดรสชาติขม ผาด โดยสารโพลีฟีนอลค่อยๆ เพิ่มขึ้นจากวันที่ 0 จนถึงวันที่ 5 ของกระบวนการหมักและลดลงในวันถัดมา ซึ่งแนวโน้มที่เกิดขึ้นคล้ายกับแนวโน้มของการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ระหว่างกระบวนการหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คอมบูชา การเพิ่มขึ้นของสารโพลีฟีนอลในน้ำชาหมักอาจเป็นเพราะการสลายตัวของโมเลกุลโพลีฟีนอลขนาดใหญ่ เนื่องจากกิจกรรมของเอนไซม์ที่สร้างโดยแบคทีเรียและยีสต์ หรือการรวมตัวกันของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ในทางกลับกันสาเหตุการเพิ่มขึ้น และลดลงของปริมาณโพลีฟีนอลอาจเกิดจากการออกซิเดชันของสารโพลีฟีนอลโดยอนุมูลอิสระของออกซิเจนจากจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะพีเอชต่ำ ซึ่งคล้ายคลึงกับการสลายตัวของสารคาเทชินที่พบตลอดกระบวนการหมัก (รูปที่ 2.3)



รูปที่ 2.3 การเปลี่ยนแปลงของสารประกอบชีวภาพสำคัญในชาระหว่างกระบวนการออกซิเดทีฟ (กระบวนการหมัก)

ที่มา : Pinto (2013)

ปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดรสชาติในคอมบูชาที่ส่งผลให้ผู้บริโภครู้สึกสดชื่น มาจากกรดอะมิโน (Amino acid) และความรู้สึกรสขมมาจากสารคาเฟอีน เนื่องจากในตอนเริ่มต้นของกระบวนการหมักไม่ได้มีการเติมแหล่งไนโตรเจนลงในน้ำชาหวาน จากการวิเคราะห์พบว่าปริมาณกรดอะมิโนเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลาการหมัก และมีรายงานว่าแบคทีเรียบางสายพันธุ์สามารถสังเคราะห์เอนไซม์เพื่อย่อยโปรตีนจนกลายเป็นกรดอะมิโน ซึ่งอาจเป็นเหตุผลของการเพิ่มขึ้นของกรดอะมิโน โดยกรด อะมิโนมีความสำคัญโดยเป็นตัวปรับปรุงรสชาติของคอมบูชา

จากการศึกษาของ Zhao *et al.*, (2018) พบว่าสารประกอบอะโรมาติกลดลงต่อเนื่อง พร้อมกับการเพิ่มขึ้นของปริมาณจุลินทรีย์ตลอดระยะเวลาการหมัก ในงานวิจัยระบุว่าจากการวิเคราะห์สารระเหยที่เป็นส่วนที่ทำให้เกิดรสชาติในชาหมัก แบ่งออกได้เป็น 7 กลุ่มคือ แอลกอฮอล์ (Alcohol) แอลดีไฮด์ (Aldehyde) คีโตน (Ketone) กรด (Acid) เอสเทอร์ (Ester) เบนซีนอยด์ (Benzenoid) และอื่นๆ ซึ่งในกลุ่มของสารระเหยเหล่านี้จะมีสารเมแทบอลิต์หลัก เช่น กรดอะซิติก กรดฟีนิลอะซิติก (Phenylacetic acid) กรดซิตริก (Citric acid) กรดดี-กลูคูโรนิก (D-glucuronic acid) กรดซัคซินิก (Succinic acid) และกรดอินทรีย์อื่นๆ กรดเหล่านี้ทำให้คอมบูชามีรสชาติเปรี้ยว และมีคุณสมบัติ และกรดอินทรีย์เหล่านี้ส่งผลต่อปริมาณกรดทั้งหมดและการลดลงของค่าพีเอช เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

องค์ประกอบของสารระเหย หรือสารที่ทำให้เกิดรสชาติมีการเปลี่ยนแปลงเนื่องมาจากกระบวนการหมักทำให้เกิดแอลกอฮอล์ แอลดีไฮด์ และกรด โดยเกิดขึ้นในช่วงเริ่มต้นไปจนถึงช่วงกลางของการหมัก กรดอะซิติกและเอสเทอร์ค่อยๆ เพิ่มขึ้นในช่วงกลางไปจนถึงจุดสิ้นสุดของการหมัก สารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (Secondary metabolites) ที่สร้างขึ้นโดยเชื้อจุลินทรีย์ในคอมบูชาเป็นสาเหตุหลักทำให้เกิดรสชาติ อีกทั้งปฏิกิริยาทางชีวเคมี การสร้างแอลกอฮอล์และแอลดีไฮด์ การเปลี่ยนโครงสร้างของสาร เป็นผลมาจากการทำงานของเชื้อจุลินทรีย์ในระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชา แสดงให้เห็นว่าเชื้อจุลินทรีย์ในคอมบูชา มีบทบาทสำคัญในการสร้างรสชาติระหว่างกระบวนการหมักของคอมบูชา (Zhao *et al.*, 2018)

Jayabalan *et al.*, (2010) รายงานว่ากรดอะมิโนเพิ่มขึ้นตามเวลาการหมัก โดยชนิดของกรดอะมิโนจำเป็นที่พบมากที่สุดคือ ไอโซลิวซีน (Isoleucine) และลิวซีน (Leucine) รองลงมาคือ ฟีนิลอะลานีน (Phenylalanine) วาลีน (Valine) เมทไธโอนีน (Methionine) ทรีโอนีน (Threonine) และทริปโตเฟน (Tryptophan) โดยกรดอะมิโนเหล่านี้มาจากการย่อยสลายของโปรตีนจากผนังเซลล์ยีสต์ และเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของแร่ธาตุจำพวก แมกนีเซียม (Mg) เหล็ก (Fe) แมงกานีส (Mn) สังกะสี (Zn)

Chen and Liu (2000) พบว่ายีสต์สามารถใช้โมเลกุลของน้ำตาลฟรุกโตสและกลูโคสเพื่อผลิตเอทานอลและกลีเซอรอลผ่านวัฏจักรไกลโคไลซิส โดยในส่วนของกลูโคสจะเป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดอินทรีย์ เช่น กรดกลูโคนิก และใช้ในการสังเคราะห์เซลล์ูโลส

### 2.1.6 ประโยชน์ของเครื่องดื่มคอมบูชา

คอมบูชาได้ถูกรายงานว่าเป็นเครื่องดื่มที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพและมีประโยชน์ในด้านอื่นๆ จากการศึกษาประโยชน์ของคอมบูชา ปัจจุบันมีการรายงานถึงประโยชน์ของคอมบูชาในด้านต่างๆ ไว้ดังนี้

#### 1. การต้าน หรือการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

คอมบูชามีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเชื้อจุลินทรีย์ได้หลายกลุ่ม เช่น *Helicobacter pylori*, *E. coli*, *Entamoeba cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*, และ *Candida albicans* โดยทั้งกรดอะซิติก และสารคาเทชิน (catechins) เป็นสารที่สามารถยับยั้งแบคทีเรีย คุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์โดยกรดอินทรีย์ที่อยู่ในคอมบูชา เป็นลักษณะการชักนำให้ไซโทพลาสซึมของเซลล์มีสถานะเป็นกรดและทำลายเซลล์แบคทีเรียในที่สุด และมีความเป็นไปได้ที่การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์มาจากสารอื่นๆ ที่พบในคอมบูชา เช่น แบคทีริโอซิน โปรตีน เอนไซม์ หรือแม้กระทั่งอนุพันธ์ของสารประกอบฟีนอลิกที่ออกมาจากชา เช่น แทนนิน (tannin) ล้วนมีความเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทั้งสิ้น ดังนั้นจะพบว่าคอมบูชาจึงอุดมไปด้วยสารประกอบที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ (Kaewkod *et al.*, 2019)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Cardoso *et al.*, (2020) ได้รายงานความเข้มข้นน้อยที่สุดของคอมบูชาจาก ชาเขียว และชาดำที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ *E. coli*, *Salmonella*, *S. aureus*, *Listeria monocytogenes* ได้ ผลการทดสอบพบว่าชาเขียวมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ทั้งหมด และชาดำสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus*, *L. monocytogenes* ได้

## 2. สารต้านอนุมูลอิสระ

แนวโน้มความนิยมในเรื่องของการใช้พอกษเคมีมาเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) โดยใช้เป็นอาหารทางเลือกเพื่อสุขภาพกำลังได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้น มีงานวิจัยว่า โมเลกุลของพอกษเคมีมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายมนุษย์ อีกทั้งยังมีการระบุถึง ประโยชน์ของกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระของคอมบูชา เช่น ป้องกันการเกิดมะเร็ง เพิ่มภูมิคุ้มกัน และ บรรเทาอาการอักเสบ

ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในคอมบูชา คุณสมบัติในข้อนี้ขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก ชนิดของชาที่นำมาใช้เป็นวัตถุดิบ และสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ในหัวเชื้อคอมบูชา ถึงแม้ว่า คุณสมบัติเกี่ยวกับฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของคอมบูชาจะขึ้นอยู่กับเวลา แต่ไม่ควรหมักนานเกินไปเนื่องมาจากการเพิ่มขึ้นของกรดอินทรีย์ที่มากเกินไปอาจเป็นอันตรายต่อการบริโภคโดยตรงได้ ดังนั้นควรที่จะปรับกระบวนการหมักเพื่อให้ได้กระบวนการหมักที่เหมาะสม เช่น จำแนกชนิดของเอนไซม์ที่มีหน้าที่ในการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของสารประกอบระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชา และระบุสารเมแทบอไลต์ที่มีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระเพื่อที่จะอธิบายกลไกต่างๆ ในกระบวนการเมแทบอไลซึมได้ เพื่อให้ได้คอมบูชาที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูง (Jayabalan *et al.*, 2014)

Jayabalan *et al.*, (2008) รายงานถึงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของคอมบูชา ที่ผลิตจากชาเขียว ชาดำ และกากชา บ่งชี้ว่าสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH อนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ (Superoxide) และกิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล (Hydroxyl) เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก

Malbaša *et al.*, (2011) ศึกษาการหมักคอมบูชาโดยใช้ชาดำและชาเขียว ผลการทดสอบการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ อนุมูลอิสระไฮดรอกซิล พบว่าในคอมบูชาจากชาดำที่ใช้หัวเชื้อ แบคทีเรียอะซิติกผสมกับเชื้อยีสต์ *Zygosaccharomyces* sp. มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูง เช่นเดียวกับคอมบูชาจากชาเขียวที่ใช้หัวเชื้อทางการค้า

Cardoso *et al.*, (2020) นำชาดำ ชาเขียว คอมบูชาจากชาดำ และคอมบูชาจากชาเขียวตรวจสอบจำนวนชนิดของสารประกอบฟีนอลิก พบว่าสารประกอบฟีนอลิกที่พบในคอมบูชาจากชาดำมีจำนวน 27 ชนิด และจำนวนสารประกอบฟีนอลิกมีความหลากหลายมากกว่า ส่งผลให้ ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของคอมบูชาในชาดำสูงกว่าตัวอย่างอื่น

### 3. ป้องกันการถูกทำลายของเซลล์ตับ

คอมบูชาถูกใช้ในการศึกษาถึงคุณสมบัติในการป้องกันการถูกทำลายของเซลล์ตับจากมลพิษทางสิ่งแวดล้อมต่างๆ ในเซลล์ของสัตว์ทดลอง และเซลล์ที่เพาะเลี้ยงขึ้นในห้องทดลอง ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าคอมบูชาสามารถป้องกันเซลล์ตับถูกทำลายโดยปัจจัยที่เกิดจากมลพิษทางสิ่งแวดล้อมได้ ซึ่งผลจากการนำคอมบูชาที่หมักโดยใช้ชาดำทดสอบกับพาราเซตามอล (Paracetamol) คาร์บอนเตตระคลอไรด์ (Carbontetrachloride) อะฟลาท็อกซิน บี1 (Aflatoxin B<sub>1</sub>) แคดเมียมคลอไรด์ (Cadmium chloride) เตตระ-บิวทิล ไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (Terta-butyl hydroperoxide: TBHP) และอะซิตามิโนเฟน (Acetaminophen) แสดงให้เห็นว่าผลกระทบความเป็นพิษของสารเคมีต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของเซลล์ตับลดลง งานวิจัยส่วนใหญ่สรุปว่าคอมบูชาอาจเป็นประโยชน์ในการป้องกันโรคตับ ซึ่งปัจจัยการเกิดโรคหลักมาจากภาวะเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidative stress) (Jayabalan *et al.*, 2014)

### 4. การต้านมะเร็ง

สารอาหารที่ใช้ป้องกันมะเร็ง (Chemoprevention) เป็นการนำอาหารที่จัดเป็น พืชผักเคมีมาผ่านกระบวนการต่างๆ ซึ่งจัดว่าเป็นวิธีการที่สามารถควบคุมเซลล์มะเร็งที่ประสบความสำเร็จ และผลข้างเคียงน้อย คอมบูชาถูกกล่าวถึงว่าเป็นเครื่องดื่มที่มีคุณสมบัติในการต้านมะเร็ง และได้รับการกล่าวถึงจากการศึกษาข้อมูลของประชากรรัสเซียโดย Central Oncological Research Unit และ Russian Academy of Sciences in Moscow (Jayabalan *et al.*, 2014)

Villarreal-Soto *et al.*, (2019) นำคอมบูชาที่หมักโดยชาดำมาทดสอบการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้มนุษย์ (HCT-116) พบว่าสามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ร้อยละ 55.3 ที่ปริมาณความเข้มข้นสารสกัดคอมบูชา 50 µg/mL งานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่าการหมักคอมบูชาโดยใช้ชาดำช่วยเพิ่มศักยภาพของสารออกฤทธิ์ชีวภาพ และช่วยเสริมการทำงานร่วมกันระหว่างกระบวนการหมักเพื่อสร้างสารเมแทบอลิต์และการทำงานของเชื้อจุลินทรีย์ นำไปสู่การสร้างสารประกอบที่น่าสนใจ

Kaewkod *et al.*, (2019) หมักคอมบูชาจากชาเขียว ชาอู่หลง และชาดำ และนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ พบว่าคอมบูชาจากชาเขียวและคอมบูชาจากชาดำให้ผลเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่

กรดอินทรีย์ในคอมบูชา เช่น กรดอะซิติก กรดกลูคูโรนิก กรดกลูโคโคนิก สาร ดี-แซคคาริก แอซิด-1,4-แลคโตน (D-saccharic acid-1,4-lactone : DSL) กรดแอสคอร์บิก และกรดซัคซินิก มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งบางชนิด ตัวอย่างเช่น สาร DSL มีความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์กลูคูโรนเดส (Glucuronidase) โดยเอนไซม์กลูคูโรนเดสจะถูกย่อยสลาย เกิดเป็นสารอะไกลโคน (Aglycones) ซึ่งเป็นสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ในส่วนของกรดกลูคูโรนิก กรดกลูโคโคนิก กรดแอสคอร์บิก กรดแลคติก มีความสามารถในการลดการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหารได้ (Kaewkod *et al.*, 2019)

## 2.2 เชื้อแบคทีเรีย *Acetobacter pasteurianus*

### 2.2.1 ลักษณะของเชื้อแบคทีเรีย *A. pasteurianus*

แบคทีเรียอะซิติก เป็นแบคทีเรียแกรมลบ หรือ สามารถย้อมติดสีได้ทั้งแกรมบวก และแกรมลบ (Gram variable) รูปร่างมีตั้งแต่ลักษณะวงรี (ellipsoidal) จนถึงเป็นแท่ง (rod shape) ต้องการอากาศ (Strictly aerobic) อยู่ในแฟมิลี Acetobacteraceae คลาส Alphaproteobacteria มีความสามารถในการออกซิไดซ์เอทานอลให้เป็นกรดอะซิติก ปัจจุบันแบคทีเรียอะซิติกถูกค้นพบและจัดกลุ่มไว้ 19 จีนัสได้แก่ *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Acidomonas*, *Gluconacetobacter*, *Asaia*, *Kozakia*, *Saccharibacter*, *Swaminathania*, *Neoasaia*, *Granulibacter*, *Tanticharoenia*, *Commensalibacter*, *Ameyamaea*, *Neokomagataea*, *Komagataeibacter*, *Endobacter*, *Swingsia*, *Nguyenibacter*, และ *Bombella* (Sengun and Karabiyikli, 2011 ; Zheng *et al.*, 2018)

*Acetobacter pasteurianus* ที่พบส่วนใหญ่จัดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีเยื่อหุ้มเมมเบรนด้านนอกที่มีส่วนประกอบหลักคือ ลิโปพอลิแซ็กคาไรด์ Lipopolysaccharides: LPS) (Pallach *et al.*, 2018) เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Acetobacter* และ *Komagataeibacter* ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตกรดอะซิติกและน้ำส้มสายชูจำนวนมาก ในประเทศแถบเอเชียและยุโรป เช่น จีน ญี่ปุ่น อิตาลีเนื่องจากความสามารถของแบคทีเรียในการออกซิไดซ์เอทานอลให้เป็นกรดอะซิติก และทนต่อเอทานอลความเข้มข้นสูงได้ มักถูกใช้ในการผลิตกรดอะซิติก (Zheng *et al.*, 2018)

*Acetobacter pasteurianus* และ *Acetobacter aceti* เป็นแบคทีเรียที่มักถูกกล่าวถึงอันดับแรกๆ ในกลุ่มจีนัส *Acetobacter* นอกจากความสามารถในการผลิตกรดอะซิติกแล้ว เชื้อ *A. pasteurianus* ยังสามารถผลิตสารประกอบอื่นได้อีก เช่น กลุ่มเอสเทอร์ อะซีโทอิน (3-hydroxy-2-butanone) ซึ่งส่งผลต่อกลิ่นรสของน้ำส้มสายชู (Zheng *et al.*, 2018, Ha *et al.*, 2011)

### 2.2.2 ปฏิกริยาการออกซิเดชันแอลกอฮอล์เพื่อผลิตกรดอะซิติก

*A. pasteurianus* ผลิตกรดอะซิติกโดยการออกซิไดซ์เอทานอล ในสภาวะที่มีอากาศ โดยมีเอนไซม์ Pyrroloquinoline quinone-dependent alcohol dehydrogenase (PQQ-ADH) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และเอนไซม์ Aldehyde dehydrogenase (ALDH) ช่วยในกระบวนการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอน อิเล็กตรอนจะถูกปล่อยจากซีสเตรท และขนย้ายโดย Ubiquinone (UQ) ไปยังออกซิเจนที่มีหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย เชื้อ *A. pasteurianus* ยังสามารถออกซิไดซ์กรดอะซิติกเกิดเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำได้ โดยกระบวนการเกิดในไซโทพลาสซึมผ่านวัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก (Tricarboxylic acid (TCA) cycle) ส่งผลให้เกิดภาวะที่เรียกว่า Overoxidation ซึ่งจะไปรบกวนกระบวนการหมักกรดอะซิติก อย่างไรก็ตามการเกิดเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

overoxidation จะเกิดขึ้นต่อเมื่อแหล่งคาร์บอนและพลังงานในกระบวนการหมักถูกใช้จนหมดเท่านั้น (Zheng *et al.*, 2018)

### 2.2.3 ความทนกรดอะซิติก

แบคทีเรียอะซิติกมีกลไกที่ทำให้ตัวเซลล์มีความสามารถในการทนต่อกรดอะซิติก การกำจัดกรดอะซิติกออกจากเซลล์ (Detoxification) รวมไปถึงการป้องกันการซึมผ่านของกรดอะซิติก โดยการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างองค์ประกอบของไขมันที่เยื่อหุ้มไซโตพลาสซึม ระบบ ABC-transporter ทำหน้าที่เสมือนตัวปั๊มประจุที่มีหน้าที่ปั๊มกรดอะซิติกออกจากเซลล์ และมีกลไกเพิ่มเติมเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนที่เยื่อหุ้ม เช่น ฟอสฟาติดีลโคลีน (Phosphatidylcholine) ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับความสามารถในการทนกรด

จีโนม *Acetobacter* มีการสร้างเพลลิเคิลโพลีแซคคาไรด์ (Pellicle polysaccharides) ที่เยื่อหุ้มเซลล์ เปรียบเสมือนไบโอฟิล์มที่ช่วยให้เชื้อทนทานต่อยาและทนต่อกรดอะซิติก ซึ่งจากการศึกษาของ Kanchanarach *et al.*, (2010) เลี้ยงเชื้อ *A. pasteurianus* ในอาหาร YPGD ที่มีการเติมเอทานอลร้อยละ 4 พบว่าเชื้อมีการเจริญเติบโตแบ่งได้เป็น 3 ระยะ คือ 1) เริ่มเจริญเติบโต และมีการออกซิไดส์เอทานอลเป็นกรดอะซิติกอย่างสมบูรณ์ (EO phase) 2) เชื้อชะลอและหยุดการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรดอะซิติกความเข้มข้นสูง (AR phase) 3) เริ่มมีการเจริญของเชื้ออีกครั้ง โดยเซลล์จะออกซิไดส์กรดอะซิติกที่สะสมอยู่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน (AO phase) โดยในช่วงปลายของการเจริญระยะ EO และ AR พบว่าเชื้อมีการสร้างเยื่อหุ้มเป็นชั้น รูปร่างไม่แน่นอน จากผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าชั้นของโพลีแซคคาไรด์ที่สร้างมาหุ้มเซลล์นั้นสามารถชะลอการแพร่ของกรดอะซิติกเข้าไปยังเซลล์ ซึ่งส่งผลให้เซลล์มีความสามารถในการทนต่อกรดอะซิติกได้

## 2.3 เชื้อยีสต์ *Zygosaccharomyces bailii*

พบได้มากในกระบวนการผลิตอาหารที่ต้องผ่านการหมัก เช่น ไวน์ คอมบูชา น้ำส้มสายชู โดยส่วนใหญ่มักพบได้ในอุตสาหกรรมเครื่องดื่ม มีการใช้เชื้อ *Z. bailii* เพื่อคุณสมบัติในเรื่องของกลิ่นรส ตัวอย่างเช่นในอุตสาหกรรมไวน์มีการนำเชื้อ *Z. bailii* มาหมักร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* เพื่อเพิ่มสารเอทิลเอสเทอร์ และพอลิแซคคาไรด์ (Polysaccharides) ในไวน์ ซึ่งส่งผลโดยตรงต่อกลิ่นรส และลักษณะทางกายภาพของไวน์ (Xu *et al.*, 2017)

### 2.3.1 ลักษณะของเชื้อยีสต์ *Z. bailii*

เซลล์มีลักษณะเป็นทรงกลมถึงรูปไข่ ขนาดประมาณ 3-9 × 3-13 ไมครอน โคลนีสที่เจริญบนอาหาร YM agar มีสีขาวขุ่น (James and Stratford, 2011) เชื้อ *Z. bailii* เป็นเชื้อที่มีความต้านทานต่อปัจจัยที่ไม่เหมาะสมบางอย่างในสิ่งแวดล้อม (Dato *et al.*, 2008) จีโนมเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*Zygosaccharomyces* เป็น non-saccharomyces yeast ประกอบด้วย 6 สปีชีส์ ซึ่งเชื้อกลุ่มนี้สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะแวดล้อมที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลและเอทานอลสูง ค่า  $a_w$  ต่ำสามารถทนสภาวะที่เป็นกรด และสามารถเจริญในอาหารที่มีการเติมสารกันบูด เช่น กรดซอร์บิก หรือ กรดเบนโซอิก เป็นเชื้อกลุ่มที่สามารถใช้ ฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน (Fructophilic yeast) ได้ (Merico *et al.*, 2003 ; Dato *et al.*, 2008)

### 2.3.2 กระบวนการสร้างเอทานอล

หนึ่งในกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอทานอลที่สำคัญคือการเกิด Crabtree effect ซึ่งโดยปกติแล้วการผลิตเอทานอลจะเกิดในสภาวะที่ไม่มีอากาศและใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในกระบวนการสร้างเท่านั้น แต่ในสภาวะที่น้ำตาลกลูโคสมีจำกัดทำให้การผลิตเอทานอลลดต่ำลง และมีการใช้ฟรุคโตสมาผลิตเอทานอลแทน เรียกว่าการเกิด Crabtree effect ซึ่งดูได้จากปริมาณเอนไซม์ Acetyl-CoA synthetase ที่เพิ่มขึ้นตามปริมาณของน้ำตาลฟรุคโตส การเกิดขึ้นของกระบวนการหมักภายใต้สภาวะที่มีอากาศก็จัดเป็นปรากฏการณ์ Crabtree effect เช่นกัน (Merico *et al.*, 2003)

### 2.3.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างเอทานอล (Azhar *et al.*, 2017)

#### 1. อุณหภูมิ

การเจริญของเชื้อยีสต์ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิในการหมัก ดังนั้นอุณหภูมิจึงมีผลต่อปริมาณเอทานอลที่เชื้อสร้างได้ ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมของเชื้อแต่ละชนิดแตกต่างกัน โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อยีสต์อยู่ในช่วง 20 ถึง 35 องศาเซลเซียส นอกเหนือจากการเจริญของเชื้อยีสต์ อุณหภูมิยังส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์เช่นกัน

#### 2. ความเข้มข้นของน้ำตาล

ความเข้มข้นของน้ำตาลสูงทำให้อัตราการหมักเพิ่มสูงขึ้น แต่หากความเข้มข้นของน้ำตาลสูงเกินไปจะทำให้กระบวนการหมักหยุดนิ่ง เนื่องจากน้ำตาลได้แพร่เข้าไปในเซลล์ของยีสต์

#### 3. ค่ากรด-เบส

ค่ากรด-เบสที่ไม่เหมาะสมอาจทำให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น นอกจากนี้ยังส่งผลต่อการเจริญของยีสต์ อัตราการหมัก และการเกิดผลพลอยได้ของกระบวนการหมัก อย่างไรก็ตามช่วงค่ากรด-เบสที่เหมาะสมในการอยู่รอดของยีสต์อยู่ระหว่าง 2.75 – 4.25

#### 4. ระยะเวลาในการหมัก

ส่งผลกระทบต่อการเจริญของเชื้อยีสต์ เช่น ระยะเวลาการหมักที่สั้นทำให้กระบวนการหมักไม่มีประสิทธิภาพเนื่องจากเชื้อยีสต์ยังเจริญเติบโตไม่เพียงพอ ในขณะที่เดียวกันหากระยะเวลาการหมักที่นานเกินไป อาจเกิดภาวะเป็นพิษที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อยีสต์

#### 5. ปริมาณหัวเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณหัวเชื้อส่งผลโดยตรงต่อการใช้น้ำตาลในกระบวนการหมัก ซึ่งจะส่งผลต่อเนื่องไปยังการผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ และเมื่อปริมาณหัวเชื้อมากระยะเวลาในการหมักจะสั้นลง

## 2.4 ชา (Tea)

ชาเป็นเครื่องดื่มที่นิยมบริโภคมากที่สุดในโลก สามารถพบได้ในอาหารหลายประเภท และมีส่วนสำคัญในการใช้บรรเทาหรือป้องกันอาการป่วย การบริโภคชาสามารถส่งผลต่างๆ ต่อร่างกาย อาทิ ป้องกันอาการแพ้ (Anti-allergic) การต้านมะเร็ง ป้องกันโรคอ้วน ต้านการกลายพันธุ์ (Anti-mutagenic) ป้องกันการเสื่อมของเซลล์ประสาท ควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด ต้านอนุมูลอิสระ ต้านเชื้อจุลินทรีย์ และต้านการอักเสบ

เนื่องจากในชานั้นมีสารประกอบทางชีวภาพหลายชนิด เช่น คาเฟอีน (Caffeine) ทีโอโบรมีน (Theobromine) อัลคาลอยด์ (Alkaloids) ที่นอกจากจะมีความเกี่ยวข้องกับการป้องกันโรคต่างๆ ยังส่งผลต่อระบบประสาทส่วนกลาง ลดอัตราการเกิดโรคพาร์คินสัน ป้องกันภาวะซึมเศร้า ต้านการอักเสบ ต้านอนุมูลอิสระ และลดการบริโภคเครื่องดื่มแอลกอฮอล์และการสูบบุหรี่

ชาที่มีปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระกลุ่มโพลีฟีนอล (Polyphenols) ในปริมาณมาก โดยเฉพาะกรดฟีนอลิก (Phenolic acids) ซึ่งกรดฟีนอลิกนี้มีประโยชน์ต่อสุขภาพหลายประการ เช่น ป้องกันการติดเชื้อที่ทางเดินปัสสาวะ และแผลในกระเพาะอาหาร รักษาสุขภาพช่องปาก สารโพลีฟีนอลยังช่วยในการลดความเสี่ยงของการเกิดหลอดเลือดตีบ (Stroke) และควบคุมระดับน้ำตาลกลูโคสในผู้ป่วยโรคเบาหวาน จากการศึกษาเกี่ยวกับชาที่ผ่านมามีพบว่าชนิดของชาที่ต่างกันจะมีองค์ประกอบของสารประกอบฟีนอลิก และสารเมธิลแซนทีนต่างกัน (Azevedo *et al.*, 2019)

ในปัจจุบันชาเป็นเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพและไม่มีแอลกอฮอล์ที่ได้รับความนิยมบริโภคเป็นอันดับสองรองจากน้ำเปล่า จากรายงานการสำรวจพบว่าร้อยละ 78 ของการผลิตและการบริโภคชาทั่วโลกเป็นชาดำ รองลงมาคือชาเขียวซึ่งมีการผลิตและบริโภคร้อยละ 20 สำหรับชาอู่หลงมีการผลิตและบริโภคประมาณร้อยละ 2 (Naveed *et al.*, 2018)

### 2.4.1 แหล่งกำเนิดชา (Habtemariam, 2019)

ต้นชา (*Camellia sinensis* หรือ *Thea sinensis*) มีต้นกำเนิดอยู่ในแถบเขตร้อนและเขตอบอุ่นของทวีปเอเชีย อเมริกาใต้ และยังพบได้ในประเทศแอฟริกัน พืชชนิดนี้อยู่ในแฟมิลี Theaceae โดยชาดำและชาเขียวมีองค์ประกอบทางเคมีที่คล้ายคลึงกัน แต่จะเกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีในชาแต่ละชนิดระหว่างกระบวนการผลิต มีผลทำให้ชาดำ ชาเขียว ชาอู่หลง และชาขาวมีความแตกต่างกัน (Naveed *et al.*, 2018)

## 2.4.2 อนุกรมวิธาน และข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ของชา

แฟ้มลี Theaceae แบ่งย่อยออกได้ 9 สกุล และแบ่งย่อยลงไปได้ 460 ชนิด ซึ่งชนิดที่มีความสำคัญในเชิงเศรษฐกิจมากที่สุดคือ *Camellia sinensis* โดยมีการนำไปเพาะปลูกเพื่อผลิตเป็นเครื่องดื่มมาหลายศตวรรษ แต่ชนิดอื่นนอกเหนือจาก *C. sinensis* ก็มีการนำไปใช้เป็นเครื่องดื่ม สกัดน้ำมัน (Cooking oil camellia (*C. oleifera*)) และปลูกเป็นไม้ประดับ (สกุล *Camellia*, *Franklinia*, *Gordonia* และ *Stewartia*) โดยการจำลัดับอนุกรมวิธานของชาได้ดังนี้

อาณาจักร	Plantae
ดิวิชัน	Tracheophyta
คลาส	Magnoliopsida
อันดับ	Ericales
วงศ์	Theaceae
สกุล	<i>Camellia</i> L.
ชนิด	<i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze

ซึ่งก่อนหน้านี้ *Camellia sinensis* (L.) Kuntze เป็นที่รู้จักกันในชื่อ *Thea sinensis* L. ถึงแม้ว่าต้นชาจะมีด้วยกันหลากหลายสายพันธุ์ แต่สายพันธุ์ที่สำคัญในเชิงเศรษฐกิจมีอยู่ 2 สายพันธุ์ ดังนี้

1) *Camellia sinensis* var. *assamica* ลักษณะใบขนาดใหญ่ ต้นสูง เจริญเติบโตเร็ว เติบโตได้ดีในเขตอบอุ่น สายพันธุ์นี้มีชื่อเรียกอีกอย่างว่า ชาอัสสัม “Assam tea” ซึ่งชาอัสสัมเป็นชาพื้นเมืองของเมืองอัสสัมประเทศอินเดีย (รูปที่ 2.4) มีความโดดเด่นกว่าสายพันธุ์อื่นๆ ที่พบในเขตทางใต้และตะวันออกเฉียงใต้ของทวีปเอเชีย รวมไปถึง มาเลเซีย และออสเตรเลีย มักจะถูกนำไปใช้ผลิตเป็นชาดำ (Black tea) ที่รู้จักกันดีคือชาปูเออร์ (Pu-erh) พบได้ที่มณฑลยูนนาน ประเทศจีน

2) *Camellia sinensis* var. *sinensis* ลักษณะใบมีขนาดเล็ก ต้นเป็นทรงพุ่ม สามารถทนต่อสภาพอากาศเย็นได้ดี เป็นที่รู้จักในชื่อ “ชาจีน – China tea” ต้นของชาสายพันธุ์นี้มีการปลูกอย่างกว้างขวางในประเทศจีน ญี่ปุ่น และไต้หวัน ซึ่งมีการใช้ชาสายพันธุ์นี้ผลิตเป็นชาเขียว ชาขาว เป็นส่วนมาก รองลงมาคือนำไปผลิตเป็นชาดำและชาอู่หลงบางส่วน

## 2.4.3 กระบวนการผลิตชา

สายพันธุ์ของชาที่มีการใช้บริโภคหลักๆ มีอยู่ 2 ชนิด คือชาจีน *Camellia sinensis* var. *sinensis* และชาอัสสัม *Camellia sinensis* var. *assamica* ประเภทของชาสามารถแบ่งได้ตาม

กระบวนการผลิตโดยแบ่งออกเป็น 3 ประเภทคือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 การปลูกต้นชาเพื่อเก็บเกี่ยวในประเทศอินเดีย  
ที่มา : Habtemariam, (2019)

2) ชาที่ผ่านกระบวนการหมักบางส่วน เรียกว่า ชาอู่หลง กระบวนการผลิตชาชนิดนี้ ใบชาสดบางส่วนต้องผ่านการหมักก่อนเข้าสู่กระบวนการอบแห้ง

3) ชาที่ผ่านกระบวนการหมักสมบูรณ์ เรียกว่า ชาดำ และ ชาผูเออร์ ซึ่งชากลุ่มนี้ผ่านขั้นตอนการหมักหลังการเก็บเกี่ยวโดยใช้เวลาในการหมักนานที่สุดในบรรดาชาทั้ง 3 กลุ่ม ก่อนที่จะนำไปนึ่งและทำให้แห้ง การหมักของชาดำทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยมีเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ในขณะที่ชาผูเออร์จะมีจุลินทรีย์เป็นตัวหลักสำคัญในกระบวนการหมัก (Bansal *et al.*, 2013)

#### 2.4.4 ชาดำ (Black Tea)

ชาดำมีสารประกอบมากมายเช่น ฟลาโวนอยด์ คาเทชิน อีฟลาวิน (Theaflavins:TFs) และ ธีรูบิกิน (Thearubigins:TRs) กรดฟีนอลิก เมทิลแซนทีน (คาเฟอีน) กรดอะมิโน (ทีอะนีน) คาร์โบไฮเดรต ไซมัน โพรตีน เบต้าแคโรทีน สารประกอบฟลูออไรด์ระเหยง่าย และวิตามิน A C K อีเล็กน้อย รวมไปถึงโพเลต ชาดำประกอบไปด้วยสารประกอบฟีนอลิก 6 กลุ่ม คือ กรดฟีนอลิก ฟลาโวนส์ (Flavones) ฟลาโวนอลส์ (Flavonols) แอนโทไซยานิน (Anthocyanins) ฟลาวานอลส์ (Flavanols) และไฮดรอกซิล-4-ฟลาวานอลส์ (Hydroxyl-4 flavanols) นอกจากนั้นยังมีสารแอลทีอานิน (L-Theanine) หรืออีกชื่อ แกรมม่า-กลูตาไมลเอไมด์ ( $\gamma$ -glutamylethylamide) เป็นกรดอะมิโนเฉพาะที่พบได้ในชาดำซึ่งคิดเป็นปริมาณร้อยละ 50 ของกรดอะมิโนทั้งหมด ซึ่งกรดอะมิโนชนิดนี้พบได้ในชา สกุล *Camellia* และพบในเห็ดบางสายพันธุ์เท่านั้น การสร้างกลิ่นรสของชาดำเป็นผลมาจากการสลายตัวของสารทีอานิน และกรดอะมิโนบางชนิดเช่น อะลานีน (Alanine) อาร์จินีน (Arginine) ทำให้เกิดรสขมในชา (Naveed *et al.*, 2018)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.4.5 ข้อมูลทางเภสัชวิทยา และคุณสมบัติในการรักษาโรค (Naveed *et al.*, 2018)

ประโยชน์ของชาดำต่อสุขภาพมีหลากหลาย เช่น ป้องกันโรคท้องเสีย ป้องกันความดันโลหิตสูง ฟันผุ ปัญหาการย่อยอาหารเนื่องจากระบบไหลเวียนโลหิตไม่ดี ลดไขมัน LDL และต้านอนุมูลอิสระ ทำให้ชาดำเป็นที่รู้จักในแง่ชาที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ

### 1. การต้านอนุมูลอิสระ และต้านการอักเสบ

ชาดำมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูง เนื่องจากชาดำประกอบด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น สารกลุ่มโพลีฟีนอล มีหลายงานวิจัยบ่งชี้ว่าสารธีฟลาวิน-3 (TF-3) และ สารธีฟลาวิน-4 (TF-4) มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงคล้ายกับการทำงานของสาร อีพิกัลโลคาเทชิน แกลเลต ((-)-Epigallocatechin gallate : (-)-EGCG) ในชาเขียว สารธีฟลาวินยังมีบทบาทสำคัญในการยับยั้งเซลล์มะเร็งหลายชนิด ต้านการอักเสบ และการแตกหักของโครโมโซม (Clastogenesis) นอกจากนี้ สารคาเทชินที่พบได้ในชาดำจัดเป็นสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงเช่นกัน และสามารถใช้ในการยับยั้งการเจริญของเนื้องอก ลดระดับน้ำตาลในเลือด และป้องกันการงอกของเส้นเลือดเนื่องจากการกระตุ้นของเซลล์เนื้องอก (angiogenesis)

### 2. ชาดำกับเซลล์มะเร็ง

สารโพลีฟีนอลในชาดำสามารถควบคุมวัฏจักรการขยายตัวของเซลล์มะเร็ง และชักนำให้เกิดการเสื่อมสลายของเซลล์ที่ตายแล้ว

### 3. โรคหัวใจและหลอดเลือด

ชาดำมีฤทธิ์ในการช่วยขยายหลอดเลือด นอกจากนี้ปริมาณสารโพลีฟีนอลในชาดำยังช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด (CVD) โดยเพิ่มประสิทธิภาพของระบบที่เกี่ยวข้องกับการขยายตัวของหลอดเลือดแดง ยับยั้งการก่อตัวของลิ่มเลือด เพิ่มภาวะการขยายตัวของหลอดเลือด ชาดำยังเป็นแหล่งของแมกนีเซียม ซึ่งการบริโภคอาหารที่มีแมกนีเซียมมีผลช่วยป้องกันโรคหลอดเลือดสมองและหัวใจล้มเหลว

### 4. ลดปริมาณคอเลสเตอรอล

ชาดำมีส่วนช่วยในการลดระดับคอเลสเตอรอลรวม (Total cholesterol : TC) และคอเรสเตอรอลที่ไม่ดี (low density lipoprotein : LDL) โดยสารฟลาโวนอยด์ในชาจะช่วยลดความเข้มข้นของไขมันที่ไม่ดี และสารโพลีฟีนอลช่วยลดระดับไตรกลีเซอไรด์ (TG) ระดับคอเรสเตอรอลรวม และไขมันที่ไม่ดี

### 5. โรคเบาหวานและโรคอ้วน

สารฟลาโวนอยด์ในชาช่วยเพิ่มอัตราส่วนอินซูลินต่อกลูโคส ซึ่งช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของอินซูลิน เช่นเดียวกับสารโพลีฟีนอลที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ของอินซูลินที่ทำให้เกิดการเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด ลดความเสี่ยงในการเกิดโรคเบาหวานชนิดไม่พึ่งอินซูลิน (Non-insulin-dependent diabetes mellitus : NIDDM)

## 6. โรคระบบทางเดินอาหารและการยับยั้งจุลินทรีย์

มีรายงานว่าชาดามีศักยภาพในการรักษาแผลในช่องปากและกระเพาะอาหาร โดยชาดามีการยับยั้งการติดเชื้อ *Helicobacter pylori* ซึ่งก่อให้เกิดโรคแผลในกระเพาะอาหาร บางรายงานยังบ่งชี้ว่าการใช้ชาดากล้วยค้อมีผลต่อการป้องกันการติดเชื้อ *Haemophilus influenzae* สารโพลีฟีนอลช่วยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ยูรีเอสในการเปลี่ยนยูเรียเป็นแอมโมเนีย เป็นการยับยั้งแบคทีเรียจากการย่อยแอมโมเนียเป็นอาหารโดยน้ำย่อย ซึ่งผลที่ได้คือช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในกระเพาะอาหาร

## 7. โรคหอบหืดและโรคมะเร็ง

สารสกัดชาดามีฤทธิ์ต้านฮีสตามีนในมาสต์เซลล์เยื่อช่องท้องของหนู (murine peritoneal mast cells : PMCs) และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส ยับยั้งการผลิตฮีสตามีนในเซลล์หนูขาวได้ถึงร้อยละ 90 โดยชาดามีปริมาณสารเคอควิทิน (Quercetin) ซึ่งเป็นสารประเภทฟลาโวนอลไกลโคไซด์อยู่ประมาณร้อยละ 54 - 71 มีรายงานว่าสารเคอควิทินมีคุณสมบัติในการต้านการอักเสบและเป็นสารป้องกันการอักเสบที่มีประสิทธิภาพ

## 2.5 กระเจี๊ยบแดง (Roselle)

กระเจี๊ยบแดง (*Hibiscus sabdariffa* L.) เป็นพืชที่เหมาะสมสำหรับเพาะปลูกในกลุ่มประเทศที่กำลังพัฒนาเนื่องจากพืชชนิดนี้เจริญเติบโตง่าย ปลูกร่วมกับพืชชนิดอื่นได้ และสามารถใช้เป็นแหล่งอาหารและเส้นใย ในประเทศจีนมีการใช้เมล็ดผลิตเป็นน้ำมัน และส่วนต้นนำไปใช้เป็นยา ในขณะที่ประเทศแถบแอฟริกาตะวันตกใช้ใบและเมล็ดสดเป็นผงไปประกอบอาหาร นอกจากนี้กระเจี๊ยบแดงยังนำไปใช้ในอุตสาหกรรมยาและอุตสาหกรรมอาหารด้วย (Da-Costa-Rocha *et al.*, 2014)

กระเจี๊ยบแดงเป็นพืชสมุนไพรที่สำคัญใช้เป็นแหล่งของสารแอนโทไซยานินและกรดชนิดต่างๆ ในแพทย์แผนโบราณมีการใช้สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงสำหรับรักษาอาการเจ็บป่วยหลายอย่างรวมถึงความดันโลหิตสูง โรคตับ และอาการไข้ สารแอนโทไซยานินมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ มีบทบาทสำคัญในการป้องกันเซลล์จากการเข้าสู่ภาวะชราและต่อสู้กับโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคทางระบบประสาท โรคหัวใจและหลอดเลือด การอักเสบ โรคเบาหวาน และโรคจากการติดเชื้อแบคทีเรีย

ปัจจุบันชากระเจี๊ยบแดงได้ถูกเพิ่มเข้าในรายการบัญชียาหลักแห่งชาติ (Thai National List of Essential Medicines) ใช้เป็นยาขับปัสสาวะ โดยมีการพัฒนากระเจี๊ยบแบบอัดเม็ดสำหรับผู้ป่วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่มีความดันโลหิตสูงและโรคเบาหวาน นอกจากนั้นยังมีการพัฒนาสารสกัดกระเจี๊ยบสำหรับ ยา อาหารและเครื่องสำอางมากขึ้น (Sukhaeng *et al.*, 2018)

### 2.5.1 แหล่งกำเนิด

กระเจี๊ยบมีการปลูกแพร่หลายในกลุ่มประเทศกำลังพัฒนา แต่เดิมนั้นกระเจี๊ยบมีถิ่นกำเนิดที่ประเทศอินเดีย และมีการนำไปกระจายเพาะปลูกในภูมิภาคต่างๆ มีชื่อเรียกแตกต่างกันไป เช่น Roselle ในภาษาอังกฤษ Congo ในภาษาฝรั่งเศส Jamaica เป็นชื่อเรียกในประเทศเม็กซิโก สเปน (Riaz and Chopra, 2018)

### 2.5.2 อนุกรมวิธาน และข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ของกระเจี๊ยบ

กระเจี๊ยบ มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ *Hibiscus sabdariffa* อยู่ในวงศ์ Malvaceae เป็นไม้ล้มลุกปีเดียว (ไม้ล้มลุกมีอายุไม่เกิน 1 ปี) หรือไม้ล้มลุกอายุหลายปี มีพุ่มย่อยสูง 2 – 2.5 เมตร ใบรูปร่างเหมือนมือมี 3 – 5 แฉก ยาว 8 – 15 เซนติเมตร ใบเรียงสลับกันบนลำต้น โดยลำต้นมีสีแดงรูปทรงกระบอก ดอกของกระเจี๊ยบ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 – 10 เซนติเมตร ใช้เวลาในการเจริญเต็มที่ประมาณ 6 เดือน โดยสามารถเก็บเกี่ยวส่วนของกลีบเลี้ยงประมาณ 3 สัปดาห์ภายหลังจากที่กระเจี๊ยบออกดอก (Riaz and Chopra, 2018) ซึ่งลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกระเจี๊ยบแสดงดังรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 ลักษณะของต้นกระเจี๊ยบ (ซ้าย) และกลีบเลี้ยงของดอกกระเจี๊ยบ (ขวา)

สกุล *Hibiscus* (Malvaceae) มีมากกว่า 300 ชนิด โดยกระเจี๊ยบแดงมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Hibiscus sabdariffa* เรียกย่อๆ ว่า Hs มีชื่อเรียกในภาษาอังกฤษมากมายเช่น roselle, hibiscus, Jamaica, sorrel หรือ red sorrel (Rocha *et al.*, 2014)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาณาจักร	Plantae
ดิวิชัน	Tracheophyta
คลาส	Magnoliopsida
อันดับ	Malvales
วงศ์	Malvaceae
สกุล	Hibiscus L.
ชนิด	<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.

กระเจี๊ยบแดง 2 สายพันธุ์หลักในไทยคือ *Hibiscus sabdariffa* var. *altissima* Wester โดยสายพันธุ์นี้มักจะปลูกเพื่อใช้ประโยชน์ในเรื่องของเส้นใยมีกลีบเลี้ยงสีเขียวย สีสแดงมีลวดลาย ส่วนของกลีบเลี้ยงไม่สามารถรับประทานได้ และอีกสายพันธุ์คือ *Hibiscus sabdariffa* var. *sabdariffa* กลีบเลี้ยงสามารถรับประทานได้ และยังให้เส้นใยด้วย (Rocha *et al.*, 2014)

### 2.5.3 พฤษเคมีของกระเจี๊ยบแดง

องค์ประกอบทางโภชนาการของกระเจี๊ยบแดงดังตารางที่ 2.1  
ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบทางโภชนาการของกระเจี๊ยบแดง

องค์ประกอบทางโภชนาการ	ปริมาณที่พบ	หน่วย
โปรตีน	1.9	กรัม ต่อ 100 กรัม
ไขมัน	0.1	กรัม ต่อ 100 กรัม
คาร์โบไฮเดรต	12.3	กรัม ต่อ 100 กรัม
กากใย	2.3	กรัม ต่อ 100 กรัม
ธาตุเหล็ก	57	มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัม
วิตามินซี	14	มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัม
แคลเซียม	1.72	มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัม
เบต้าแคโรทีน	300	ไมโครกรัม ต่อ 100 กรัม

ที่มา : Rocha *et al.*, (2014)

### 2.5.4 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในกระเจี๊ยบ

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญในกระเจี๊ยบประกอบไปด้วย สารกลุ่มพอลิแซ็กคาไรด์ กรดอินทรีย์ ฟลาโวนอยด์ และแอนโทไซยานิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงประกอบไปด้วยกรดอินทรีย์ เช่น กรดซิตริก กรดแอสคอร์บิก กรดมาลิก กรดฮิบัสคัส (Hibiscus acid) กรดออกซาลิก กรดทาร์ทาริก นอกจากนี้ยังมีสารไฟโตสเตอรอล (Phytosterols) สารโพลีฟีนอล (Polyphenols) สารแอนโทไซยานิน (Anthocyanins) และสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถละลายในน้ำได้ (Riaz and Chopra, 2018)

### 1. กรดอินทรีย์

กระเจี๊ยบแดงอุดมไปด้วยกรดอินทรีย์ โดยกรดชนิดหลักที่พบคือ กรดซิตริก กรดไฮดรอกซีซิตริก (Hydroxycitric acid) กรดฮิบัสคัส (Hibiscus acid) กรดมาลิก และกรดทาร์ทาริก (Tartaric acid) ชนิดของกรดที่พบรองลงมาคือ กรดออกซาลิก (Oxalic acid) และกรดแอสคอร์บิก หรือวิตามินซี (Ascorbic acid) กรดไฮดรอกซีซิตริกพบได้ที่กลีบเลี้ยงของกระเจี๊ยบ โครงสร้างของกรดมีความแตกต่างจากกรดไฮดรอกซีซิตริกที่สกัดได้จากพืชชนิดอื่น (Rocha *et al.*, 2014)

### 2. โพลีฟีนอลและฟลาโวนอยด์

สารโพลีฟีนอลและฟลาโวนอยด์หลายชนิดพบได้ในส่วนกลีบเลี้ยงของกระเจี๊ยบแดง ซึ่งช่วยเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของกระเจี๊ยบ ฟีนอลิกที่พบในพืชส่วนใหญ่ประกอบด้วยสารฟลาโวนอยด์ เช่น กอสซีเพทิน (Gossypetine) ฮิบิเซทิน (Hibiscetin) สารแอนโทไซยานิน เช่น เดลฟินิดิน-3-กลูโคไซด์ (Delphinidin-3-glucoside) แซมบูไบโอไซด์ (Sambubioside) และ ไซยานิดิน-3-แซมบูไบโอไซด์ (Cyanidin-3-sambubioside) (Riaz and Chopra, 2018)

### 3. แอนโทไซยานิน (Anthocyanins)

สารแอนโทไซยานินอยู่ในกลุ่มอนุพันธ์ของสารฟลาโวนอยด์ เป็นสารสีธรรมชาติในกลีบเลี้ยง โดยชนิดของสารแอนโทไซยานินที่พบส่วนใหญ่ในกระเจี๊ยบแดงคือ Delphinidin-3-sambubioside และ Cyanidin-3-sambubioside ส่วนสาร Delphinidin-3-glucoside และ Cyanidin-3-glucoside จะพบได้เล็กน้อย (Rocha *et al.*, 2014) โดยโครงสร้างโมเลกุลสารแอนโทไซยานินง่ายต่อการสลาย ความคงตัวของสารขึ้นอยู่กับค่าพีเอช อุณหภูมิ เอนไซม์ แสง และสารโลหะชนิดอื่นๆ (Wu *et al.*, 2018) การใช้ตัวทำละลายในการสกัดสารจากกระเจี๊ยบแดงต่างกัน ทำให้สารแอนโทไซยานินและสารฟีนอลิกที่สกัดออกมาแตกต่างกัน และส่งผลถึงคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดนั้นด้วย (Riaz and Chopra, 2018)

### 4. กลุ่มสารพอลิแซ็กคาไรด์ และคาร์โบไฮเดรต

พอลิแซ็กคาไรด์เป็นกลุ่มสารสำคัญที่มีปริมาณมากในกลีบเลี้ยง เช่น อะราบินโนส (Arabinose) กาแลคโตส (Galactose) กลูโคส และยังมีกรดกาแลคทูโรนิก (Galacturonic acid) กรดกลูคูโรนิก (Glucuronic acid) แมนโนส (Mannose) และไซโลส (Xylose) อีกเล็กน้อย (Riaz and Chopra, 2018)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 5. สารระเหย

สารระเหยในกระเจี๊ยบแดงทำหน้าที่เป็นสารให้กลิ่นซึ่งพบในเมล็ดมากกว่า 25 ชนิด และพบในส่วนกลีบเลี้ยง 37 ชนิด ส่วนใหญ่อยู่ในรูปไฮโดรคาร์บอนไม่อิ่มตัว แอลกอฮอล์ แอลดีไฮด์ อนุพันธ์ของกรดไขมัน อนุพันธ์ของน้ำตาล เทอร์ปีนส์ (Terpenes) อนุพันธ์ของฟีนอลิก เช่น ยูจินอล (Eugenol) และสารประกอบไขมันอื่นๆ (Rocha *et al.*, 2014)

### 2.5.5 การใช้งานกระเจี๊ยบแดง (Riaz and Chopra, 2018)

กระเจี๊ยบเป็นพืชที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ทุกส่วน ไม่ว่าจะเป็นส่วนของใบ ดอก กลีบเลี้ยง ลำต้น หรือแม้กระทั่งส่วนเมล็ดก็มีการนำไปใช้งาน โดยการใช้ประโยชน์ของกระเจี๊ยบ แบ่งออกเป็น การใช้เป็นอาหาร และการใช้ในการรักษา

#### 1. ใช้เป็นอาหาร

ยอดอ่อนของกระเจี๊ยบแดงสามารถรับประทานแบบดิบได้โดยใส่ในสลัด ส่วนเมล็ดซึ่งอุดมไปด้วยโปรตีน ประเทศจีนมีการนำไปสกัดน้ำมัน ในแอฟริกามีการนำไปใช้แทนเมล็ดกาแฟ และสกัดเป็นน้ำมัน

กลีบเลี้ยงกระเจี๊ยบสามารถแปรรูปได้หลายวิธีไม่ว่าจะนำไปแช่แข็งหรือตากแห้งเพื่อเก็บไว้รับประทานนอกฤดู ทำเป็นเครื่องดื่ม แยม เจลลี่ ซอส ไวน์ และนำไปผลิตเป็นสารแต่งสีในอาหาร เนื่องจากกลีบเลี้ยงของกระเจี๊ยบแดงเป็นแหล่งของสารเพคตินจึงมีการแนะนำให้ใช้กลีบเลี้ยงในอุตสาหกรรมถนอมผลไม้

#### 2. ใช้ในการรักษาโรค

กระเจี๊ยบถูกนำไปใช้ในตำรายาแผนโบราณเพื่อรักษาอาการไข้ ปวดฟัน การติดเชื้อในกระเพาะปัสสาวะ เป็นต้น ในประเทศไทยมีการขึ้นทะเบียนในตำรับยาแผนโบราณสำหรับการรักษาไข้ในไตและกระเพาะปัสสาวะ เช่นเดียวกับในประเทศอินเดียมีการใช้กระเจี๊ยบแดงในการรักษาโรค ใช้บรรเทาอาการปวดในการขับปัสสาวะ และช่วยรักษาอาการอาหารไม่ย่อย การนำกลีบเลี้ยงมาแช่ หรือที่เรียกว่า ชาซูดาน (Sudan Tea) ถูกนำมาใช้บรรเทาอาการและลดอุณหภูมิในร่างกาย การดื่มชากระเจี๊ยบยังช่วยรักษาโรคตับ อาการไข้ โรคไขมันในเลือดสูง ความดันโลหิตสูง แก้อาการเกร็ง (Antispasmodic) และเป็นสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (Riaz and Chopra, 2018)

## 2.6 สารอนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และดัชนีชี้วัด

### 2.6.1 สารอนุมูลอิสระ (Free radical)

ระหว่างกระบวนการเมแทบอลิซึมและการสัมผัสกับสิ่งแวดล้อม จะมีการสร้างสารอนุมูลอิสระขึ้นในร่างกาย แล้วเข้าสู่โมเลกุลชีวภาพขนาดใหญ่จำพวกโปรตีน ไขมัน และกรดนิวคลีอิก ทำให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์และเนื้อเยื่อหรือส่งผลให้ยีนเกิดการกลายพันธุ์ ความเข้มข้นสูงของอนุมูลอิสระเป็นเหตุให้เซลล์หรือเนื้อเยื่อเกิดการตายได้ เมื่อนำอนุมูลอิสระไปใช้ประโยชน์ในการรักษาไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อนุมูลอิสระในร่างกายสามารถก่อให้เกิดภาวะเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidative stress) โดยการทำลายสมดุลปฏิกิริยารีดอกซ์ เป็นสาเหตุในการเกิดโรคเรื้อรังหลายชนิด มีงานวิจัยหลายชิ้นยืนยันว่าอนุมูลอิสระและความไม่สมดุลของปฏิกิริยารีดอกซ์ภายในเซลล์มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็ง ภาวะหลอดเลือด เบาหวาน ต้อกระจก โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคพาร์กินสัน โรคอัลไซเมอร์ และโรคข้ออักเสบ ดังนั้นอนุมูลอิสระจึงเป็นต้นเหตุสำคัญที่ส่งผลต่อสุขภาพมนุษย์ (Li *et al.*, 2014)

การออกซิเดชันสามารถเกิดได้ทั้งในอาหารและกับร่างกายมนุษย์ โดยในอาหารสามารถเกิดได้ตั้งแต่กระบวนการเก็บเกี่ยวไปจนถึงการจัดเก็บ ซึ่งการเกิดออกซิเดชันนี้ส่งผลต่อรสชาติ ลักษณะอาหาร สารอาหาร รวมไปถึงความเป็นพิษที่อาจเกิดขึ้นได้เมื่ออาหารถูกออกซิไดส์ ในส่วนของร่างกายมนุษย์นั้นการออกซิเดชันสามารถก่อให้เกิดโรคต่างๆ อาทิเช่น โรคมะเร็ง การอักเสบภายในร่างกาย และการเสื่อมสภาพของเซลล์ (Cirillo and Lemma, 2012)

## 2.6.2 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)

สารต้านอนุมูลอิสระ คือ สารที่มีผลในการชะลอหรือป้องกันการเกิดออกซิเดชันในสารตั้งต้นได้ มีความเข้มข้นต่ำเมื่อเทียบกับสารตั้งต้นที่ออกซิไดส์ได้ สามารถพบสารต้านอนุมูลอิสระเป็นส่วนประกอบในอาหารหลายชนิด ซึ่งมีผลในการลดผลข้างเคียงของสารอนุมูลอิสระ โดยสารต้านอนุมูลอิสระสามารถแบ่งได้เป็น 3 ชนิด คือ สารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติ (Natural antioxidant) สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (Synthetic antioxidant) และสารต้านอนุมูลอิสระเลียนแบบธรรมชาติ (Nature-identical antioxidant) ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระชนิดเลียนแบบธรรมชาติใช้ในการป้องกันการเกิดออกซิเดชันในอุตสาหกรรมอาหารเท่านั้น (Cirillo and Lemma, 2012 ; Li *et al.*, 2014)

อย่างไรก็ตามมีการประเมินว่าการใช้สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์สามารถก่อความเป็นพิษได้ สารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติจึงถูกนำมาใช้เป็นหลักเพราะไม่เพียงแต่มีบทบาทสำคัญในการป้องกันและการรักษาโรค แต่ยังสามารถหลีกเลี่ยงอาการไม่พึงประสงค์ของสุขภาพมนุษย์ได้ (Li *et al.*, 2014)

### 2.6.2.1 การทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระจะเข้าไปขัดขวางกระบวนการออกซิเดชันโดยการให้อะตอมไฮโดรเจน หรือให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระเพื่อให้ตัวอนุมูลมีความเสถียร (Cirillo and Lemma, 2012) ซึ่งสารต้านอนุมูลมีลักษณะการทำงานดังนี้

#### 1. Free radical scavenging หรือการทำงานแบบ Chain-breaking

การปล่อยประจุให้แก่สารอนุมูลอิสระอย่างต่อเนื่องจนกว่ากระบวนการเกิดอนุมูลอิสระจะสิ้นสุดลง หรือจนกว่าตัวสารอนุมูลอิสระจะมีความเสถียร เนื่องจากโมเลกุลของสารต้านอนุมูลอิสระเองจำเป็นต้องให้ประจุแก่อนุมูลข้างเคียงต่อเนื่องไป จากกระบวนการนี้ทำให้เกิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อนุมูลอิสระอื่นขึ้นอีกอย่างต่อเนื่อง ดังนั้น สารต้านอนุมูลอิสระจึงมีหน้าที่ปล่อยประจุแก่อนุมูลอิสระอย่างต่อเนื่องโดยลักษณะการทำงานนี้พบในวิตามินอี วิตามินซี เบต้าแคโรทีน เป็นต้น

## 2. Singlet oxygen quenching

ลักษณะการยับยั้งการทำงานของอนุมูลอิสระออกซิเจน ( $^1O_2$ ) โดยเปลี่ยนให้อยู่ในรูป Triplet oxygen ( $^3O_2$ ) ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระเช่น สารแคโรทีนอยด์ (Carotenoids) ไลโคปีน (Lycopene)

## 3. Metal chelating

กลไกการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระในลักษณะเข้าไปจับกับสารโลหะหนักเช่น  $Fe^{2+}$   $Cu^{2+}$  เพื่อชะลอการเกิดอนุมูลอิสระ ซึ่งโลหะหนักเหล่านี้สามารถเร่งการเกิดอนุมูลอิสระได้หลายชนิด เช่น อนุมูลอิสระออกซิเจน อนุมูลอิสระไฮดรอกซิล ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ กรดแอสคอร์บิก กรดซิตริก เป็นต้น

## 4. ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (Enzyme inhibitor)

การเข้ายับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระ โดยเข้าจับกับ Cofactor เพื่อให้เอนไซม์ดังกล่าวไม่สามารถทำงานได้ ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น กรดฟีนอลิก สารแกแลคต สารประกอบฟีนอลิกบางชนิด เป็นต้น (Vertuani *et al.*, 2004)

### 2.6.2.2 สารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติ (Natural antioxidant)

กลุ่มสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติสามารถพบได้แพร่หลาย โดยสร้างจากพืชเป็นส่วนใหญ่ และสามารถพบได้จากการสร้างของเชื้อจุลินทรีย์ เห็ดรา รวมทั้งสร้างโดยร่างกายของมนุษย์เอง ทั้งนี้สารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติสามารถแบ่งออกเป็นสารกลุ่มเอนไซม์ (Enzymatic) และสารที่ไม่ใช่เอนไซม์ (Non-enzymatic) (Atta *et al.*, 2017)

#### 1. สารกลุ่มเอนไซม์ (enzymatic)

เอนไซม์ที่ทำหน้าที่ต้านอนุมูลอิสระจะทำงานโดยทำให้อนุมูลอิสระเสถียร ยับยั้งการทำงานของอนุมูลอิสระก่อนที่จะเข้าไปทำลายเซลล์ มีการให้อิเล็กตรอนเพื่อทำให้อนุมูลอิสระเสถียร รวมทั้งรบกวนการออกซิไดซ์แบบห่วงโซ่ของอนุมูลอิสระ ประกอบไปด้วย

- 1) Superoxide dismutase (SOD)
- 2) Catalase (CAT)
- 3) Glutathione peroxidase (GPx)
- 4) Glutathione Reductase (GR)

#### 2. สารที่ไม่ใช่เอนไซม์ (Non-enzymatic)

สารต้านอนุมูลอิสระกลุ่มที่ไม่ใช่เอนไซม์ แบ่งออกเป็น สารต้านอนุมูลอิสระที่ออกฤทธิ์โดยตรง ซึ่งมีความสำคัญอย่างยิ่งในการป้องกันภาวะถูกออกซิไดซ์เกินสมดุล สารกลุ่มนี้

ประกอบด้วย กรดแอสคอร์บิก กรดไลโปอิก (lipoic acid) สารโพลีฟีนอล และแคโรทีนอยด์ ซึ่งสารเหล่านี้ล้วนพบได้ในอาหาร

## 2.1 วิตามินอี (Vitamin E)

วิตามินอี เป็นอนุพันธ์ของฟีนอลิกที่ละลายในไขมัน ประกอบด้วย หมู่ไฮดรอกซิลซึ่งเป็นส่วนสำคัญของความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ มีความสามารถปกป้องเยื่อหุ้มทางชีวภาพของร่างกายมนุษย์รวมถึงกรดนิวคลีอิกในเซลล์จากอนุมูลอิสระ โดยวิตามินอีสามารถยับยั้งอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ( $O_2^-$ ) ยับยั้งการทำงานของ singlet oxygen และเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (Superoxide dismutase : SOD) กลไกการยับยั้งอนุมูลอิสระเป็นในลักษณะการให้โปรตรอนไปยับยั้งปฏิกิริยาลูคโซ่ Lipid peroxidation และสร้างระบบสารต้านอนุมูลอิสระร่วมกับเอนไซม์กลูตาไทโอน เพอร์ออกซิเดส (Glutathione peroxidase : GSH-Px) (Atta *et al.*, 2017 ; Denisov and Afanasev, 2006)

## 2.2 วิตามินซี (Vitamin C)

วิตามินซี หรือ กรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid) เป็นวิตามินที่สามารถละลายในน้ำ พบได้มากในผักผลไม้ จัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ออกฤทธิ์โดยตรง โดยการทำปฏิกิริยากับอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ( $O_2^-$ ) และ Singlet oxygen เช่น อนุมูลไฮดรเปอร์ออกซิล ( $HOO^{\cdot}$ ) อนุมูลไฮดรอกซิล ( $OH^{\cdot}$ ) โดยกระบวนการ Dehydrogenation เกิดเป็นสาร Dehydroascorbate และสามารถออกฤทธิ์โดยอ้อมโดยการให้อะตอมไฮโดรเจนแก่วิตามินอีเพื่อลดการออกซิไดส์วิตามินอีลง (Denisov and Afanasev, 2006 ; Li *et al.*, 2014)

## 2.3 โพลีฟีนอล (Polyphenol)

โพลีฟีนอลเป็นสาร Secondary metabolite ของพืช พบในอาหารของมนุษย์ โครงสร้างเป็นการเชื่อมต่อกันของฟีนอลิก รวมไปถึงพอลิเมอร์ของฟลาโวนอยด์ (Cirillo and Lemma, 2012)

### 2.3.1 สารประกอบฟีนอลิก

ฟีนอลิกมีคุณสมบัติในการป้องกัน รักษา ทำหน้าที่เป็นสารสี พบได้ในส่วนต่างๆ ของพืช เช่น ดอก ใบ ผล (Cirillo and Lemma, 2012) มีคุณสมบัติในการยับยั้งอนุมูล ROS (Reactive oxygen species) ซึ่งชักนำให้เกิดการทำลาย DNA โปรตีน ไขมัน (Prasanth *et al.*, 2019) โดยชนิดของฟีนอลิกที่พบมากที่สุดในน้ำชาคือ กรดคลอโรจีนิก (Chlorogenic acids : CGA) กรดแกลลิก (Gallic acid : GA) ซึ่งปริมาณกรดแกลลิกที่พบในชาดำสูงกว่าชาเขียว (Li *et al.*, 2020) Zhao *et al.*, (2019) รายงานว่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของชา 30 แห่่งมีความเกี่ยวข้องกับค่า FRAP และ TEAC ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

ที่สูงส่งผลต่อกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ ลดกิจกรรมของอนุมูลอิสระลง นอกจากนี้กรดแกลลิกยังมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH มากกว่าวิตามินซีอีกด้วย

### 2.3.2 ฟลาโวนอยด์ (Flavonoid)

เป็นสารที่พบได้มากในพืช มีฤทธิ์ทางยา มีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกับอีก 2 กลุ่ม คือ ไอโซฟลาโวนอยด์ (Isoflavonoid) และ นีโอฟลาโวนอยด์ (Neoflavonoid) (Grotewold, 2006) โดยฟลาโวนอยด์แบ่งเป็น 6 กลุ่ม คือ Flavone (Apigenin), Flavonol (Quercetin), Flavanone (Naringenin), Flavanol (Catechin), Anthocyanin, Isoflavone (Genistein) (Pascual-Teresca *et al.*, 2010) ซึ่งแต่ละกลุ่มต่างกันที่โครงสร้างตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซิล การออกฤทธิ์ของสารกลุ่มนี้มี 2 แบบ คือ 1) ทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยจับกับอนุมูลเปอร์ออกไซด์ อนุมูลไฮดรอกซิล และอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ และจับกับกลุ่มเอนไซม์เพื่อยับยั้งกิจกรรมการสร้างอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ 2) ทำหน้าที่เหมือนโลหะคีเลต (metal chelators)

#### 1. แอนโทไซยานิน (Anthocyanin)

พบได้ในผัก ผลไม้ เช่น องุ่น ราชเบอร์รี่ กระจับแดง กะหล่ำม่วง เป็นต้น (Wu *et al.*, 2018) Tsai *et al.*, (2002) นำกระจับแดงแห้งต้มในน้ำเดือด ตรวจปริมาณสารฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ FRAP (Ferric reducing ability of plasma) ORAC (Oxygen radical absorbance capacity) TAS (Total activity status) พบว่าเมื่อเพิ่มเวลาในการต้ม และปริมาณดอกกระจับแดงที่มากขึ้น จะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้น ความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี FRAP และ ORAC มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับปริมาณแอนโทไซยานินที่มากขึ้น Wu *et al.*, (2018) รายงานว่าสารสกัดกระจับแดงอุดมไปด้วยสารแอนโทไซยานิน และมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูง

#### 2. คาเทชิน (Catechin)

คาเทชินมีชื่อทางเคมีว่า Flavan-3-ols พบในชาดำประมาณร้อยละ 10 ของน้ำหนักใบชาดำแห้ง โดยมี Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) เป็นสารประกอบหลัก สารคาเทชินเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์สูง สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง ลดปริมาณน้ำตาลในเลือด (Naveed *et al.*, 2018)

#### 3. ทีฟลาวิน (Theaflavin :TFs)

สารทีฟลาวินพบในชาดำประมาณร้อยละ 3 ของน้ำหนักใบชาดำแห้ง (Naveed *et al.*, 2018) เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการออกซิเดทีฟในการผลิตชาดำ โดยเกิดจากการ

ออกซิไดส์สารคาเทชิน (Flavan-3-ols) ได้เป็นสารธีฟลาวิน ซึ่งสารนี้ทำให้น้ำชาเกิดสีส้มแดงและมีรสชาติฝาด (Pinto, 2013)

#### 4. ซีรูบิกิน (Thearubigin : TRs)

เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการออกซิเดทีฟในการผลิตชาดำ พบในชาดำประมาณร้อยละ 12 ของน้ำหนักใบชาดำแห้ง (Naveed *et al.*, 2018)

#### 2.6.3 ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Total Antioxidant Capacity) (โอภา, 2550)

การวัดปริมาณการเกิดสารชีวโมเลกุลที่ถูกอนุมูลอิสระทำให้เสียหาย รวมทั้งองค์ประกอบทั้งหมดหรือภาวะรีดอกซ์โดยรวม โดยหลักการวิเคราะห์ที่สำคัญมีอยู่ 2 ประเภทคือ

1) การวิเคราะห์จากการส่งผ่านอะตอมไฮโดรเจน (Hydrogen atom transfer: HAT) เช่น วิธี Oxygen radical absorbance capacity assay (ORAC) และวิธี Total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP)

2) การวิเคราะห์จากการส่งผ่านอิเล็กตรอนเดี่ยว (Electron transfer: ET หรือ SET) ได้แก่ วิธี The Ferric reducing ability of plasma assay (FRAP) วิธี Trolox equivalent antioxidant capacity assay (TEAC) และ Diphenyl-1-picrylhydrazyl assay (DPPH) เป็นต้น

##### 2.6.3.1 วิธี TEAC

ใช้สาร 2,2-azino-bis 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid radical (ABTS) เป็นสารให้กำเนิดอนุมูล  $ABTS^{\cdot+}$  ที่มีสีและมีความคงตัว วัดการขจัด  $ABTS^{\cdot+}$  เปรียบเทียบกับสารโพร็อกซึ่งเป็นอนุพันธ์ของวิตามินอีที่ละลายน้ำ เมื่อเติมสารต้านอนุมูลอิสระลงไปจะทำให้มีสีลดลง ซึ่งปฏิกิริยาการกำจัดอนุมูล  $ABTS^{\cdot+}$  แสดงดังรูปที่ 2.6 ผลวิเคราะห์จะคำนวณเป็นค่าที่สมมูลกับสารต้านอนุมูลมาตรฐานโพร็อก

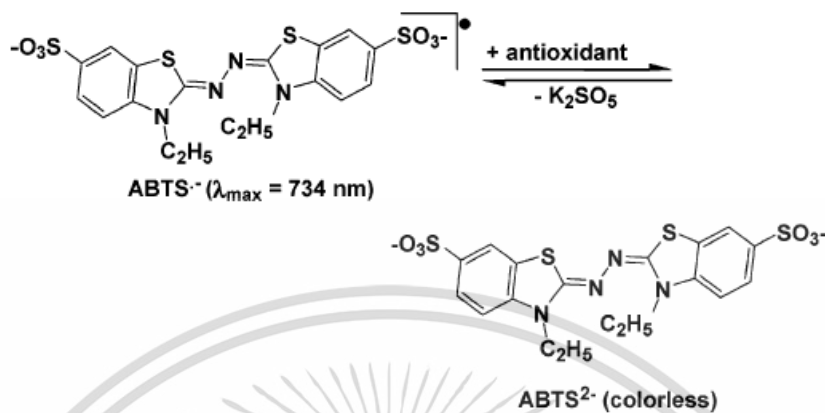
ข้อดีของวิธี TEAC คือ ทำได้ง่าย อนุมูล  $ABTS^{\cdot+}$  จะทำปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วกับสารต้านอนุมูลอิสระ การวิเคราะห์ทำได้ในช่วงพีเอชกว้าง และอนุมูล  $ABTS^{\cdot+}$  สามารถละลายได้ทั้งในน้ำและสารละลายอินทรีย์ จึงสามารถใช้วิเคราะห์หาความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารต่างๆ ไม่ว่าจะเป็สารที่ละลายน้ำ หรือสารละลายในลิพิด และสามารถศึกษากลไกได้โดยละเอียด ข้อเสียคือ ABTS ไม่จัดเป็นสารตามธรรมชาติที่ก่อให้เกิดอนุมูลในเซลล์หรือร่างกาย

##### 2.6.3.2 วิธี DPPH

อนุมูล DPPH $\cdot$  เป็นอนุมูลไนโตรเจนที่คงตัว มีสีม่วงอยู่ในรูปอนุมูลอยู่แล้ว โดยไม่ต้องทำปฏิกิริยาเพื่อให้เกิดอนุมูล การวัดความสามารถในการรีดิวซ์โดยวัดการลดลงของสีเมื่อเติมสารต้านอนุมูลลงไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อดีของวิธีนี้คือง่ายและสามารถในเครื่องมือทั่วไปในการวัด นิยมใช้เป็นวิธีเบื้องต้นในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารธรรมชาติ ยกเว้นสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่มีการดูดกลืนแสงในช่วงเดียวกัน อนุมูลชนิดนี้มีความคงตัวไม่ไวต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลที่เกิดในเซลล์หรือ



รูปที่ 2.6 ปฏิกิริยาการขจัดอนุมูลอิสระ ABTS<sup>•+</sup>

ที่มา : Huang *et al.*, (2005)

ในร่างกาย นอกจากนี้อิเล็กตรอนเดี่ยวของ DPPH<sup>•</sup> จะถูกบดบังด้วยวงเบนซีน 3 วง และหมู่ไนโตรเจนในโครงสร้าง ทำให้สารต้านอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์แรงแต่มีขนาดใหญ่ไม่สามารถเข้าไปทำปฏิกิริยา หรือเกิดปฏิกิริยาขจัดอนุมูลอิสระได้ช้ากว่าความเป็นจริง (โอภา, 2550) โดยกลไกการขจัดอนุมูลอิสระ DPPH<sup>•</sup> แสดงดังรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.7 ปฏิกิริยาการขจัดอนุมูลอิสระ DPPH<sup>•</sup>

ที่มา : Alam *et al.*, (2013)

## 2.7 การทำแห้ง (Drying)

กระบวนการทำแห้งแบบ Freeze drying หรือที่รู้จักกันอีกชื่อว่า กระบวนการไลโอไฟไลซ์ (Lyophilization) เป็นวิธีการผลิตที่ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ในรูปแบบผง และของแห้งคุณภาพสูง ซึ่งวิธีการ freeze drying เป็นวิธีการทำแห้งที่เหมาะสมสำหรับอาหารที่มีสารประกอบที่ไวต่ออุณหภูมิและง่ายต่อการเกิดออกซิเดชัน กระบวนการนี้เกิดขึ้นที่อุณหภูมิต่ำภายใต้สภาวะสุญญากาศ นิยมนำมาใช้กับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารจากพืช ผลไม้ โดยสามารถแบ่งประเภทของผลิตภัณฑ์จากพืชได้ดังนี้ 1) อาหารที่อยู่ในรูปของแข็ง เช่น ผลไม้ หรือผักที่ยังไม่ผ่านการตัดแปรรูป 2) อาหารที่อยู่ในรูปของเหลวชั้น สารละลาย เช่น น้ำผัก น้ำผลไม้ น้ำผลไม้เข้มข้น (Purees) น้ำเชื่อม (Syrup) เป็นต้น การใช้ Freeze drying ในการทำแห้งไม่ได้จำกัดแต่เพียงผัก หรือผลไม้เท่านั้น มีการใช้ในผลิตภัณฑ์กลุ่มอื่นๆ ที่ผลิตจากพืชเช่นกัน เช่น ชา กาแฟ โดย Freeze dried ถูกนำมาใช้ในการผลิตชาปรุงสำเร็จ (Instant Tea) เนื่องจากสามารถเก็บรักษาสารระเหย และสารประกอบในชา (Bhatta *et al.*, 2020)

### 2.7.1 หลักการ Freeze drying (Bhatta *et al.*, 2020)

การเปลี่ยนแปลงของน้ำทั้งสามสถานะ ของแข็ง ของเหลว และแก๊สในกระบวนการ freeze drying อาศัยหลักการระเหิด (sublimation) ของน้ำ เนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงของความดันและอุณหภูมิ โดยผลิตภัณฑ์ที่จะเข้ากระบวนการ freeze drying ต้องนำไปแช่แข็งเพื่อลดอุณหภูมิ เปลี่ยนสถานะน้ำให้กลายเป็นของแข็ง หลังจากนั้นจะเข้าสู่กระบวนการที่มีแรงดันสูงเพื่อเปลี่ยนสถานะจากของแข็งให้เป็นไอ

กระบวนการ freeze drying ทำให้เกิดการเปลี่ยนสถานะของแข็งของน้ำ (น้ำแข็ง) ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน 1) การแช่แข็ง (Freezing) ตัวอย่าง 2) การทำแห้งขั้นต้น (primary drying) เพื่อให้ น้ำแข็งเกิดการระเหิดที่ความดันต่ำกว่าความดันบรรยากาศ และ 3) การทำแห้งขั้นที่สอง (secondary drying) เป็นการนำส่วนของน้ำที่ยังไม่ถูกแช่แข็งที่หลงเหลืออยู่ออกจากอาหารส่วนที่แห้งแล้ว

#### 1. การแช่แข็ง (Freezing)

การแช่แข็งเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้เกิดการก่อตัวของโครงสร้างและขนาดของผลึกน้ำแข็ง อัตราการแช่แข็งที่ช้าทำให้เกิดโครงสร้างผลึกน้ำแข็งขนาดใหญ่ ซึ่งขนาดผลึกมีผลต่อการทำแห้ง โดยขนาดผลึกน้ำแข็งที่ใหญ่เกิดการระเหิดได้ง่ายกว่า และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำแห้งในขั้นต้น (primary drying)

#### 2. Primary drying

ใช้ระบบสุญญากาศลดความดันบรรยากาศลงเพื่อทำให้อุณหภูมิต่ำสุด (Shelf temperature) เพิ่มขึ้นจนถึงจุดที่ทำให้ผลึกน้ำแข็งในผลิตภัณฑ์เริ่มเกิดกระบวนการระเหิด โดยอุณหภูมิต่ำสุดจะต้องต่ำกว่าอุณหภูมิการยุบสลายของโครงสร้างผลิตภัณฑ์ (Collapse temperature :  $t_c$ ) เพื่อป้องกันโครงสร้างของผลิตภัณฑ์เสียหาย

#### 3. Secondary drying

เกิดขึ้นเมื่อกระบวนการระเหิดกำลังดำเนินอยู่ โดยขั้นตอนนี้เป็นการเพิ่มอุณหภูมิต่ำสุดเพื่อดึงเอาส่วนที่ยังเหลืออยู่ออกจากผลิตภัณฑ์ แต่อุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นจะต้องต่ำกว่าอุณหภูมิการเปลี่ยนสถานะคล้ายแก้ว (Glass transition temperature :  $t_g$ ) ของผลิตภัณฑ์แห้ง สิ่งที่ต้องพิจารณา

ระวางในชั้นตอนนี้คือหากอุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นก่อนที่น้ำแข็งจะเกิดการระเหิด หรือก่อนจุดสิ้นสุดของชั้นตอน Primary drying อาจทำให้โครงสร้างของผลิตภัณฑ์เสียหายและส่งผลกระทบต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์แห้งที่ได้

## 2.7.2 ปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพผลิตภัณฑ์สุดท้ายและสารสำคัญในผลิตภัณฑ์

### 1. การแช่แข็ง (Freezing)

อัตราเร็วในการแช่แข็งส่งผลถึงขนาดของผลึกน้ำแข็งที่ก่อตัวขึ้น ซึ่งมีผลต่อเนื่องไปถึงการอบแห้งในขั้นถัดไป โดยขนาดผลึกต้องสอดคล้องกับการถ่ายเทมวลความร้อนในขณะทำแห้ง เพื่อให้รูพรุนที่เกิดขึ้นมีความเหมาะสมและผลิตภัณฑ์สุดท้ายมีคุณภาพสม่ำเสมอ (Oetjen and Haseley, 2004 ; Bhatta *et al.*, 2020) Harnkarnsujarit *et al.*, 2012 ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิในการแช่แข็งและสารประกอบที่เป็นของแข็งต่อโครงสร้างและคุณสมบัติของตัวอย่างเมื่อผ่านการ freeze drying โดยใช้อุณหภูมิแช่แข็งที่ -20 -40 และ -80 องศาเซลเซียส ซึ่งรูพรุนมีขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อลดอุณหภูมิลงเนื่องมาจากการแช่แข็งอย่างรวดเร็วในอุณหภูมิต่ำ มีการเกิดผลึกน้ำแข็งอย่างรวดเร็ว และใช้เวลาน้อยในการขยายขนาดของผลึก ซึ่งกระบวนการแช่แข็งที่ต่างกันทำให้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายมีความคงตัวต่างกัน

### 2. Drying aid

การทำแห้งด้วยวิธี Freeze drying จะต้องมีการเติมสารช่วยทำให้แห้ง (Drying aid) เพื่อป้องกันการจับตัวเป็นก้อนของผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Anti-caking) โดยมีหน้าที่ในการเพิ่มค่า  $t_g$  ลดความหนืด ทำให้การผลิตแห้งทำได้อย่างต่อเนื่อง ทั้งยังส่งผลถึงคุณภาพภายหลังการจัดเก็บด้วย (Mosquera *et al.*, 2010) สารที่นำมาใช้เป็น Drying aid มีหลายชนิด เช่น มอลโตเด็คซ์ทรีน (Aaltodextrins) กัมอะราบิก (Gum arabic) แป้งชนิดแว็กซ์ (Waxy starch) อินูลิน (Inulin) เซลลูโลส (Cellulose) โดยสารมอลโตเด็คซ์ทรีนเป็นสารที่นิยมนำมาใช้ในกระบวนการ freeze drying (Michalska and Lech, 2018)

มอลโตเด็คซ์ทรีนเป็นส่วนผสมของโอลิโกแซ็กคาไรด์ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของแป้ง มีค่าสมมูลของเด็คซ์โทรส (Dextrose Equivalent : DE) เฉลี่ยอยู่ระหว่าง 5-18 (ค่าเฉลี่ยผลิตภัณฑ์มอลโตเด็คซ์ทรีนในท้องตลาด) พบได้ในผลิตภัณฑ์อาหารที่ถูกทำแห้ง และสารละลายเข้มข้น มีรสชาติหวานปานกลาง (BeMiller, 2019) มอลโตเด็คซ์ทรีนถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในการผลิตอาหารแบบผงเพื่อยืดอายุของผลิตภัณฑ์ เนื่องจากความสามารถในการขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์มและคุณสมบัติคล้ายพลาสติกจึงสามารถป้องกันการเกิดออกซิเดชันในอาหารผงได้ โดยค่าสมมูลของเด็คซ์โทรส (Dextrose Equivalent : DE) ของมอลโตเด็คซ์ทรีนส่งผลโดยตรงต่อต้นทุนและประสิทธิภาพการผลิต (Mosquera *et al.*, 2010)

มอลโตเด็คซ์ทรีนมีลักษณะเป็นผงสีขาว หรือเป็นของเหลวข้น ละลายน้ำได้ง่าย หากมีค่า DE ต่ำผู้บริโภคจะไม่ได้รับรสชาติหวานเมื่อรับประทาน มีค่าไกลซีมิกอินเด็กซ์ (Glycemic index) เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

index : GI) 105 – 110 มีการนำมอลโตเด็กซ์ทรินมาใช้ทดแทนสารให้ความหวานในเครื่องดื่ม ทำหน้าที่เป็น สารคงตัวในอาหาร ทำให้อาหารมีความชื้นเหนียว เพิ่มความหนาแน่น (Bulk density) มักใช้ในผสมกับอาหารในการทำแห้งแบบผง แป้งที่นำมาใช้ผลิตมีหลายชนิด เช่น แป้งข้าวโพด แป้งสาาลี แป้งมันสำปะหลัง การผลิตมอลโตเด็กซ์ทรินเริ่มจากการนำแป้งไปให้ความร้อนจนเกิดเจล (Gelatinization) และทำการย่อยด้วยกรด หรือเอนไซม์ การผลิตโดยใช้กรดเพียงอย่างเดียวนั้นทำให้ได้มอลโตเด็กซ์ทรินที่อุดมไปด้วยพอลิเมอร์สายโซ่ตรงซึ่งทำให้ง่ายต่อการคืนตัว จึงมีการใช้เอนไซม์อะไมเลสมาทำการย่อยสารหลังจากผ่านการย่อยด้วยกรดเพื่อให้มอลโตเด็กซ์ทรินที่ได้มีคุณสมบัติดูดความชื้นต่ำ (Low hygroscopicity) ความสามารถในการละลายน้ำสูง (Tiefenbacher, 2017)

Mosquera *et al.*, (2009) ทดลองนำมอลโตเด็กซ์ทรินที่มีค่า DE ต่างกันมาใช้ผสมก่อนเข้ากระบวนการทำผงแห้งผลโพรโจ และศึกษาคุณภาพหลังการจัดเก็บเปรียบเทียบกับการไม่ผสมมอลโตเด็กซ์ทรินพบว่า การเพิ่มขึ้นของ  $a_w$  และค่าปริมาณความชื้นสมดุลต่ำกว่าผลิตภัณฑ์ที่ไม่มีการเติมมอลโตเด็กซ์ทริน ซึ่งช่วยให้ผลิตภัณฑ์มีความคงตัวมากกว่าผลิตภัณฑ์ผงแห้งที่ไม่มีการผสมมอลโตเด็กซ์ทริน

### 3. องค์ประกอบทางเคมีในตัวอย่าง

#### ความเข้มข้นของน้ำตาล

ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ส่งผลต่อกระบวนการทำแห้งแบบ freeze drying โดยหากความเข้มข้นของน้ำตาลหรือไขมันสูงทำให้คุณภาพของของผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้ต่ำกว่ามาตรฐาน เมื่อมีน้ำตาลสูงในผลิตภัณฑ์ เช่น ผลิตภัณฑ์น้ำส้มเข้มข้น น้ำเชื่อม อุณหภูมิที่ใช้ในการแช่แข็ง (Freezing) จะต้องตั้งค่าให้ต่ำกว่าระดับอุณหภูมิที่เหมาะสม อย่างไรก็ตามในขณะลดอุณหภูมิในขั้นตอนการแช่แข็ง น้ำตาลอาจจะย้ายไปรวมอยู่ที่ผิวหน้าของผลิตภัณฑ์และเกาะตัวเป็นชั้นปิดกั้นการแพร่ของน้ำ ซึ่งส่งผลต่อเนื่องไปยังขั้นตอน Primary drying ชั้นที่ก่อตัวขึ้นนี้จะขวางการระเหิดของน้ำ เมื่อทำการลดความดันบรรยากาศชั้นที่ปิดอยู่จะแตกออกและน้ำแข็งอาจจะละลายทำให้เกิดการระเบิดภายในโครงสร้างผลิตภัณฑ์ ซึ่งทำให้คุณภาพผลิตภัณฑ์ไม่เป็นไปตามที่ต้องการ

ในผลิตภัณฑ์ที่เป็นของเหลวนั้นมีปัจจัยที่ส่งผลต่อคุณภาพผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นภายหลังการ freeze dried คือองค์ประกอบทางเคมีที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์ ซึ่งองค์ประกอบทางเคมีเหล่านี้ส่งผลโดยตรงต่อ glass transition temperature และยิ่งส่งผลถึงค่าความเข้มข้นของของแข็งในผลิตภัณฑ์ด้วย

การนำอาหารที่มีน้ำตาลเป็นส่วนประกอบสูงไปทำการ Freeze drying เสี่ยงต่อการเกิดการดูดความชื้นของน้ำตาลในตัวอย่าง เกิดปัญหาเรื่องการเหนียวติดเครื่องจักรขณะทำการ Freeze drying (Bhatta *et al.*, 2020)

### 2.7.3 ข้อดีและข้อเสียของกระบวนการทำแห้งแบบ freeze drying (Oetjen and Haseley, 2004 ; สุนทรีย์, 2537 )

#### ข้อดี

1. การทำแห้งด้วยอุณหภูมิต่ำช่วยลดความเสี่ยงในการเสียหายของผลิตภัณฑ์ที่ไม่ทนความร้อน
2. สามารถควบคุมความชื้นและกำหนดคุณสมบัติทางกายภาพของผลิตภัณฑ์แห้งได้
3. ผลิตภัณฑ์แห้งสามารถคืนรูปได้ง่าย
4. สามารถรักษากลิ่นรส และสารสำคัญในผลิตภัณฑ์ไว้ได้มาก Laokuldilok and Kanha (2015) นำสารสกัดแอนโทไซยานินเข้มข้นทำเป็นผงด้วยวิธี freeze drying โดยสามารถให้ปริมาณผลผลิตแห้งสูงอีกทั้งยังสามารถรักษาสารแอนโทไซยานินไว้ได้มาก

#### ข้อเสีย

1. ผลิตภัณฑ์จับเป็นก้อนได้ง่าย เนื่องจากผลิตภัณฑ์แห้งมีความหนาแน่น (Bulk density) ต่ำ และสามารถดูดความชื้นได้ จึงต้องมีการปรับกระบวนการ Freeze drying ให้เหมาะสม และเติมสารช่วยป้องกันการจับตัวเป็นก้อน เพื่อเพิ่มคุณสมบัติทางกายภาพที่ดี ช่วยในการละลาย
2. ลงทุนสูง ค่าใช้จ่ายในการจัดการและซ่อมแซมสูง
3. กระบวนการทำงานของเครื่องซับซ้อน ต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในการควบคุมเครื่อง

## 2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เชื้อจุลินทรีย์ที่มีบทบาทและมีความสำคัญในกระบวนการหมักคอมบูชา คือ แบคทีเรียอะซิติก และยีสต์ โดยแบคทีเรียที่พบเป็นชนิดต้องการอากาศในการเจริญเติบโตและสามารถสร้างเซลล์ulos ที่มีลักษณะเป็นแผ่นคล้ายเห็ด กลุ่มยีสต์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการหมัก คือกลุ่มยีสต์ที่สามารถผลิตแอลกอฮอล์ (Greenwalt *et al.*, 2000 ; Liu *et al.*, 1996 ; Jayabalan *et al.*, 2014)

ปิยวรรณ และคณะ (2562) ทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์จากหัวเชื้อคอมบูชา 3 แหล่ง คือ กรุงเทพมหานคร นนทบุรี และ เชียงใหม่ ทดสอบความสามารถในการผลิตแอลกอฮอล์ของยีสต์และปริมาณกรดทั้งหมดของแบคทีเรียในอาหารซาด้าหวาน พบว่าเชื้อยีสต์ไอโซเลต YN403 สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้สูงสุด และทนพีเอชต่ำได้ดี เชื้อแบคทีเรียไอโซเลต AJ605 สามารถผลิตปริมาณกรดได้สูงสุด เมื่อนำจุลินทรีย์ทั้งสองไอโซเลตไปทำการจำแนกด้วยข้อมูลทางพันธุกรรม พบว่าเป็นยีสต์ *Zygosaccharomyces bailii* และเป็นแบคทีเรีย *Acetobacter pasteurianus*

Liu *et al.*, (1996) ได้แยกเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตคอมบูชาจากแหล่งผลิตในประเทศไต้หวัน 3 แห่ง ได้แก่ มณฑลไทเป (Taipei) มณฑลซินจู๋ (Hsinchu) และมณฑลเจียอี้ (Chiayi) พบว่ามีกลุ่มแบคทีเรีย *Acetobacter* และยีสต์ เมื่อนำเชื้อจุลินทรีย์ทั้งสองกลุ่มที่ได้มาจำแนกโดยอาศัยความแตกต่างของคุณสมบัติทางชีวเคมีและทางสรีรวิทยา พบว่าเป็นแบคทีเรีย *A. aceti*, *A. xylinum* และ *A. pasteurianus* ซึ่งมีคุณสมบัติในการผลิตแผ่นเซลล์ลูลอส สำหรับยีสต์ที่จำแนกได้จากเครื่องต้มคอมบูชา ได้แก่ *S. cerevisiae* และ *Z. bailii* ซึ่งสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีความเป็นกรดและมีน้ำตาลสูง

Malbasá *et al.*, (2011) ศึกษาอัตราส่วนของหัวเชื้อคอมบูชาต่อฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ โดยใช้หัวเชื้อที่คัดแยกได้ 3 ตัวอย่าง คือ หัวเชื้อผสมระหว่างแบคทีเรียอะซิติกและ *Zygosaccharomyces* sp. หัวเชื้อผสมระหว่างแบคทีเรียอะซิติกและ *S. cerevisiae* และ หัวเชื้อคอมบูชาดั้งเดิม หมักชาดำและชาเขียวที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นร้อยละ 7 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร หมักที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธีดีพีพีเอช (DPPH) พบว่า หัวเชื้อทั้ง 3 ตัวอย่างสามารถใช้ในการหมักคอมบูชาและมีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ คอมบูชาที่เตรียมจากชาดำจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระสูงที่สุดเมื่อหมักร่วมกับหัวเชื้อผสมระหว่างแบคทีเรียอะซิติกกับ *Zygosaccharomyces* sp. และคอมบูชาที่เตรียมจากชาเขียวจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระสูงที่สุดเมื่อหมักร่วมกับหัวเชื้อดั้งเดิม

Cali *et al.*, (2014) พบว่าคอมบูชาที่หมักด้วยชาเขียว ชาดำ และเศษผงชาดำ มีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ โดยคอมบูชาที่เตรียมจากชาเขียวมีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ซุปเปอร์ออกไซด์ไอออน และอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลสูงที่สุด ในขณะที่ชาดำมีความสามารถในการรีดิวซ์ของสารต้านอนุมูลอิสระสูงสุด

Sun *et al.*, (2014) หมักคอมบูชาจากชาดำร่วมกับต้นอ่อนข้าวสาลีคั้นสดในอัตราส่วนผสมที่แตกต่างกัน บ่มที่อุณหภูมิ  $21 \pm 1$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดโดยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric method ปริมาณฟลาโวนอยด์ รวมถึงศึกษาชนิดของสารประกอบฟีนอลิกด้วยเครื่อง HPLC และศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ในระหว่างกระบวนการหมัก พบว่า คอมบูชาจากชาดำและต้นอ่อนข้าวสาลีมีส่วนประกอบของกรดฟีนอลิกหลายชนิด ซึ่งจะพบคาเฟอิก (Caffeic) เป็นส่วนใหญ่ พบกรดแกลลิก (Gallic acid) กรดคลอโรเจนิค (Chlorogenic acid) กรดฟีรูลิก (Ferulic acid) รุทีน (Rutin) และคาเทชิน (Catechin) ซึ่งสารประกอบเหล่านี้มีปริมาณสูงขึ้นตามระยะเวลาการหมัก นอกจากนี้คอมบูชาที่หมักร่วมกับชาดำและต้นอ่อนข้าวสาลีในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงสุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระเจี๊ยบแดง (*Hibiscus sabdariffa* L.) เป็นพืชที่จัดในวงศ์ชบา (Malvaceae) เป็นพืชที่มีการบริโภคกันอย่างกว้างขวาง โดยส่วนที่นิยมนำไปใช้งานคือ กลีบเลี้ยง (Calyxes) ซึ่งอุดมไปด้วยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น สารในกลุ่มโพลีฟีนอล ฟลาโวนอล และแอนโทไซยานิน เช่น สารเดลฟินิดิน-3-แซมบูโอไซด์ (Delphinidin-3-sambuoside) สารไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ (Cyanidin-3-glucoside) ทำให้กระเจี๊ยบมีคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ (Marcial *et al.*, 2012)

Tsai *et al.*, (2002) รายงานว่ากระเจี๊ยบแดงมีสารแอนโทไซยานิน กรดมาลิก กรดแอสคอร์บิก และแร่ธาตุโดยเฉพาะแคลเซียม ธาตุเหล็ก มีน้ำตาลกลูโคสปริมาณน้อย กระเจี๊ยบแดงอุดมไปด้วยสารประกอบฟีนอลิก มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 และ *Escherichia coli* ATCC 8739

Wu *et al.*, (2018) นำกลีบเลี้ยงกระเจี๊ยบแดงสกัดสารและตรวจสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ พบว่า สารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงอุดมไปด้วยสารแอนโทไซยานิน และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง สารแอนโทไซยานินในกระเจี๊ยบแดงสามารถทนความร้อนได้ระดับหนึ่ง

มีการศึกษาเกี่ยวกับการทำน้ำผลไม้ที่มีลักษณะผงแห้ง เช่น นันทินิตย์ (2016) ศึกษาการผลิตเครื่องดื่มผงจากน้ำส้มสายชูหมักผสมน้ำผลไม้ พบว่า เครื่องดื่มประกอบด้วยน้ำผลไม้เข้มข้น น้ำผึ้ง น้ำส้มสายชูหมักจากแอปเปิ้ลและน้ำ ในสัดส่วนร้อยละ 13:8:4:75 โดยปริมาตร ตามลำดับ นำเครื่องดื่มนี้ไปทำให้เข้มข้นที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 150 นาที เพื่อให้ได้ค่า TSS ประมาณ 75 °brix จากนั้นเติมสารช่วยทำให้แห้ง คือ มอลโตเด็คซ์ทริน (Maltodextrin) ในปริมาณร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก นำไปอบแห้งในตู้อบลมร้อนอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง บรรจุของ ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีการวัดค่าร้อยละ 0.38 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ค่า  $a_w$  0.21 และค่าการละลายร้อยละ 100 มีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดน้อยกว่า 10 CFU/g ไม่พบยีสต์รา ไม่พบจำนวนโคลิฟอร์มทั้งหมดและ *Escherichia coli*

Romero-González *et al.*, (2020) ได้นำพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดต่างๆ เช่น มอลโตเด็คซ์ทริน อินนูลิน กัมอะราบิก ผสมกับสารสกัดมาเกี๊ยะเบอร์รี่ (Maqui Berry) ในอัตราส่วนต่างๆ ก่อนเข้ากระบวนการ Freeze drying และนำตัวอย่างทดสอบปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ เช่น ฟีนอลิก แอนโทไซยานิน และศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และการเปลี่ยนแปลงทางเคมีต่างๆ รวมทั้งศึกษาอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ พบว่าการเติมมอลโตเด็คซ์ทรินความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ทำให้ประสิทธิภาพการทำแห้งสูงสุดและความเข้มข้นของสารพอลิแซ็กคาไรด์ที่เติมลงไป ส่งผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพของผลิตภัณฑ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 วัตถุดิบ อุปกรณ์ และสารเคมี

##### 3.1.1 วัตถุดิบ

- 3.1.1.1 ชาดำอบแห้ง จากตำบลลาวี อำเภอแม่สรวย จังหวัดเชียงราย ประเทศไทย
- 3.1.1.2 ดอกกระเจี๊ยบแดงสด ปลูกที่ตำบลหนองงูเห่า อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม ประเทศไทย
- 3.1.1.3 น้ำตาลทรายขาว
- 3.1.1.4 มอลโตเด็กซ์ทริน

##### 3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์

- 3.1.2.1 หัวเชื้อคอมบูชาทางการค้า ชื้อจากจังหวัดนนทบุรี
- 3.1.2.2 เชื้อแบคทีเรีย *Acetobacter pasteurianus* AJ605 แยกได้จากกระบวนการหมักคอมบูชา (ปิยวรรณ และคณะ, 2019)
- 3.1.2.3 เชื้อยีสต์ *Zygosaccharomyces bailii* YN403 ที่แยกได้จากกระบวนการหมักคอมบูชา (ปิยวรรณ และคณะ, 2019)

##### 3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

- 3.1.3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ
  - 1) อาหาร DRBC (Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar)
  - 2) อาหาร YPD Agar (Yeast Extract Peptone Dextrose Agar)
  - 3) อาหาร GYC Agar (Glucose, Yeast Extract, Calcium Carbonate Agar)
  - 4) อาหาร GYCE Broth (Glucose, Yeast Extract, Absolute Ethanol)
  - 5) อาหาร PCA (Plate Count Agar)
  - 6) Peptone
- 3.1.3.2 สารเคมี
  - 1) เอบีทีเอส (ABTS; 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt
  - 2) ดีพีพีเอช; ทุ,ทุ-ไดฟิโนล-วัน-พิดริลไฮดราซิล (DPPH; 2,2-diphenyl-1-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

picrylhydrazyl)

- 3) แอลกอฮอล์บริสุทธิ์ 99.5% (Absolute ethyl alcohol)
- 4) อะลูมิเนียม ไตรคลอไรด์ (Aluminium trichloride)
- 5) เอทิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้นร้อยละ 70 (70% Ethyl alcohol)
- 6) สารโฟลีนไซโอแคลทิว (Folin-Ciocalteu reagent)
- 7) กรดแกลลิก (Gallic acid)
- 8) กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid)
- 9) ฟีนอล (Phenol)
- 10) ฟีนอล์ฟทาลีน (Phenolphthalein)
- 11) โพแทสเซียมคลอไรด์ (Potassium chloride)
- 12) โพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลต (Potassium hydrogen phthalate)
- 13) โพรพานอล (Propanol)
- 14) เควอซิทิน (Quercetin)
- 15) โซเดียมอะซิเตท (Sodium acetate)
- 16) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide)
- 17) โซเดียมไนไตรต์ (Sodium nitrite)
- 18) กรดซัลฟิวริก (Sulphuric acid)
- 19) โพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต (Potassium persulfate)

### 3.1.4 เครื่องมือและอุปกรณ์

- 3.1.4.1 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร
- 3.1.4.2 ขวดลดความดัน (Suction flask) ขนาด 1000 มิลลิลิตร
- 3.1.4.3 ไมโครปิเปตทิป (Micropipette tip) ขนาด 200 และ 1000 ไมโครลิตร
- 3.1.4.4 ขวดพลาสติกฝาเกลียว ขนาด 60 มิลลิลิตร สำหรับเก็บตัวอย่าง
- 3.1.4.5 หลอดปั่นเหวี่ยง (Centrifuge tube) ขนาด 50 มิลลิลิตร
- 3.1.4.6 ปิเปต (Pipette) ขนาด 1 5 และ 10 มิลลิลิตร
- 3.1.4.7 ขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask) ขนาด 10 25 100 500 และ 1000 มิลลิลิตร
- 3.1.4.8 กรวยกรองบุชเนอร์ (Buchner funnel) ขนาด 47 และ 90 มิลลิเมตร
- 3.1.4.9 บิวเรตต์ (Burette)
- 3.1.4.10 โหลแก้วขนาด 250 400 1000 ลิตร สำหรับกระบวนการหมัก
- 3.1.4.11 คิวเวทซ์ชนิดควอทซ์ (Quartz-cuvette)
- 3.1.4.12 ไมโครเพลท 96 หลุม (96-well plate)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.1.4.13 ไมโครปิเปต (Micro pipette) ขนาด 10-100 20-200 และ 100-1000 ไมโครลิตร
- 3.1.4.14 กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และ เบอร์ 4 (Filter papers)
- 3.1.4.15 มีดผ่าตัดสแตนเลส เบอร์ 3
- 3.1.4.16 กรรไกรสแตนเลส
- 3.1.4.17 เครื่องวัดพีเอช (pH Meter) (Mettler Toledo SevenCompact™, USA)
- 3.1.4.18 เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) (Shimadzu UV-1800, Japan)
- 3.1.4.19 เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Weight scale 4 digit) (Sartorius TE2145, Germany)
- 3.1.4.20 เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Weight scale 2 digit) (Sartorius BSA32025-CW, Germany)
- 3.1.4.21 ชุดปั๊มสุญญากาศ (Suction pump) (Jeiotech VG-11, Korea)
- 3.1.4.22 เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography-GC) (Shimadzu GC-2014, Japan)
- 3.1.4.23 เครื่องอ่านปฏิกิริยาไมโครเพลท (Microplate reader) (BMG LABTECH FLUOstar Omega, Germany)
- 3.1.4.24 หม้อนึ่งอัดแรงดัน (Autoclave) (TOMY ES315, Japan)
- 3.1.4.25 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) (HERMILE Z383K, Germany)
- 3.1.4.26 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (Mettler UN110, Germany)
- 3.1.4.27 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) (Mettler INB 500, Germany)
- 3.1.4.28 ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Static incubator shaker HASUC HSYC-2112B, China)
- 3.1.4.29 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow cabinet) (Astec Microflow ABS1200, United Kingdom)
- 3.1.4.30 เครื่องตีปั่น (Paddle blender-stomacher)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 3.2 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

### 3.2.1 การเตรียมวัตถุดิบ

นำกระเจียบแดงมาล้างทำความสะอาด คั่วจนเอาส่วนเมล็ดออก จากนั้นอบให้แห้งด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส 3 วันหรือจนกว่าความชื้น (Moisture content) จะเท่ากับร้อยละ 10 (Amaya-Cruz *et al.*, 2019 ; สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2556) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

### 3.2.2 ศึกษาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นในหัวเชื้อคอมบูชาทางการค้า

เตรียมหัวเชื้อชาดำโดยตัดแปลงจาก Jayabalan *et al.*, (2007) ต้มน้ำให้เดือดประมาณ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที หลังจากนั้นเติมชาดำร้อยละ 0.4 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรทิ้งไว้ 15 นาที กรองชาออกและเติมน้ำตาลซูโครสร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ทิ้งให้เย็นเติมหัวเชื้อคอมบูชาเดิมที่เป็นส่วนของเหลวร้อยละ 10 โดยปริมาตร และเติมแผ่นเซลล์ูโลสจากหัวเชื้อคอมบูชาเดิมร้อยละ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปิดด้วยผ้าขาวบางที่ผ่านการฆ่าเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้อง 10 วัน จากนั้นตรวจนับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกในส่วนของเหลวของหัวเชื้อด้วยเทคนิค Spread plate และวิเคราะห์เชื้อในส่วนที่เป็นแผ่นเซลล์ูโลส โดยทำการตัดแผ่นเซลล์ูโลสเป็นชิ้นเล็กๆ เติมน้ำละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ใส่ลงในถุงตีปั่นและนำเข้าเครื่องตีปั่น (Paddle Blender-Stomacher) ตัดแปลงจาก Teoh *et al.*, (2004) เปิดตัวอย่างลงบนจานอาหาร Glucose Yeast extract Calcium carbonate agar (GYC agar) สำหรับตรวจนับเชื้อแบคทีเรียอะซิติก และ Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol agar (DRBC) สำหรับตรวจนับเชื้อยีสต์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน จากนั้นตรวจนับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญบนผิวหน้าอาหารรายงานในหน่วย cfu/mL

### 3.2.3 ศึกษาความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสง (Optical Density) กับปริมาณเซลล์ของเชื้อ *Acetobacter pasteurianus* AJ605 และ *Zygosaccharomyces bailii* YN403 เพื่อเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น

นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *Acetobacter pasteurianus* AJ605 ซึ่งแยกได้จากหัวเชื้อทางการค้า (ปิยวรรณ และคณะ, 2562) เลี้ยงในอาหาร Glucose Yeast Extract Ethanol broth (GYE broth) ในสภาวะเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเชื้อ *Zygosaccharomyces bailii* YN403 ที่แยกได้จากหัวเชื้อทางการค้า (ปิยวรรณ และคณะ, 2562) เลี้ยงในอาหาร Yeast Extract Peptone Dextrose broth (YPD broth) ในสภาวะเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเปิดตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร มาทำการเจือจางด้วยสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร บันทึกค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ พร้อมกับทำการตรวจนับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ (LOG cfu/mL) โดยนำตัวอย่างที่เจือจางไปทำการ Spread plate โดยเชื้อแบคทีเรียตรวจวิเคราะห์บนอาหาร GYC agar และเชื้อยีสต์ตรวจวิเคราะห์บนอาหาร DRBC agar

ทำการทดสอบ 3 ซ้ำและหาค่าเฉลี่ย จะได้สมการความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อจุลินทรีย์กับค่าการดูดกลืนแสง ( $OD_{600}$ )

### 3.2.4 ศึกษาการเจริญของเชื้อ *A. pasteurianus* AJ605 และ *Z. bailii* YN403 (Growth curve) ในอาหารขาดำหวาน

นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *A. pasteurianus* AJ605 และ *Z. bailii* YN403 ซึ่งแยกได้จากหัวเชื้อทางการค้า (ปิยวรรณ และคณะ, 2562) เลี้ยงในอาหารขาดำหวานที่เตรียมโดยต้มน้ำให้เดือด เติมน้ำตาลความเข้มข้นร้อยละ 0.4 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร นาน 15 นาที จากนั้นเติมน้ำตาลทรายความเข้มข้นร้อยละ 10 แบ่งใส่พลาสติกปริมาตรอาหาร 150 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง ทำการตรวจนับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ (LOG cfu/mL) โดยปิเปตตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร มาทำการเจือจางด้วยสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร นำตัวอย่างที่เจือจางไปทำการ Spread plate โดยเชื้อแบคทีเรียตรวจวิเคราะห์บนอาหาร GYC agar และเชื้อยีสต์ตรวจวิเคราะห์บนอาหาร DRBC agar

ทำการทดสอบ 3 ซ้ำและหาค่าเฉลี่ย จะได้กราฟแสดงลักษณะการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารขาดำหวาน

### 3.2.5 ศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของเชื้อ *A. pasteurianus* AJ605 และ *Z. bailii* YN403 สำหรับการหมักคอมบูชา

#### 3.2.5.1 การเตรียมหัวเชื้อ *A. pasteurianus* AJ605 และ *Z. bailii* YN403

เตรียมอาหารขาดำหวานโดยต้มน้ำให้เดือด เติมน้ำตาลความเข้มข้นร้อยละ 0.4 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร นาน 15 นาที จากนั้นเติมน้ำตาลทรายความเข้มข้นร้อยละ 10 แบ่งใส่พลาสติกปริมาตรอาหาร 150 มิลลิลิตร เชื้อเชื้อ *A. pasteurianus* AJ605 และ *Z. bailii* YN403 ลงในอาหารขาดำหวานโดยเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียและยีสต์แยกกัน นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 150 รอบต่อนาที

#### 3.2.5.2 การหมักคอมบูชา

ดัดแปลงจาก Jayabalan *et al.*, (2008) เตรียมขาดำหวานโดยต้มน้ำให้เดือด ประมาณ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที หลังจากนั้นเติมน้ำตาลความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ทั้งไว้ 15 นาที เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แบ่งใส่เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขวดหมัก ปริมาตรอาหาร 350 มิลลิลิตรต่อโหล เติมหั่วเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียอะซิติกและยีสต์ที่ได้จากหัวข้อ 3.2.4.1 ลงในขวดหมักตามอัตราส่วนดังตารางที่ 3.1

**ตารางที่ 3.1** อัตราส่วนของปริมาณเชื้อ *A. pasteurianus* AJ605 และ *Z. bailii* YN403 (ร้อยละโดยปริมาตร) ในกระบวนการหมักคอมบูชา

ชุดทดลอง	ปริมาณเชื้อ (ร้อยละโดยปริมาตร)	
	<i>A. pasteurianus</i> AJ605	<i>Z. bailii</i> YN403
1	10	0
2	8	2
3	6	4
4	5	5
5	4	6
6	2	8
7	0	10

ปิดโหลหมักด้วยผ้าขาวบางที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปั่นที่อุณหภูมิห้องนาน 21 วัน และทำการเก็บตัวอย่างวันที่ 0 3 7 และ 10 วิเคราะห์คุณภาพทางเคมี คุณภาพทางจุลินทรีย์ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และกิจกรรมการดักจับอนุมูลอิสระ จากนั้นทำการเลือกอัตราส่วนเชื้อที่ให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระสูงเพื่อศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างชาดำ และกระเจี๊ยบแดงต่อไป

### 3.2.6 ศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างชาดำ และกระเจี๊ยบแดงสำหรับการหมักคอมบูชา

เพื่อให้คอมบูชามีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงขึ้น และมีรสชาติที่แปลกใหม่จากคอมบูชาเดิม จึงนำกระเจี๊ยบแดงมาใช้เป็นวัตถุดิบร่วมกับชาดำในการหมักคอมบูชา

#### 3.2.6.1 การเตรียมหั่วเชื้อบริสุทธิ์

เตรียมหั่วเชื้อบริสุทธิ์ของเชื้อ *A. pasteurianus* AJ605 และ *Z. bailii* YN403 ตามวิธีการข้อ 3.2.4.1

#### 3.2.6.2 การหมักคอมบูชา

ชั่งชาดำและกระเจี๊ยบแดงอบแห้งตามอัตราส่วน ดังตารางที่ 3.2เตรียมชาดำ ชาดำผสมกระเจี๊ยบแดงในอัตราส่วนต่างๆ และน้ำกระเจี๊ยบ โดยต้มน้ำให้เดือดอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที หลังจากนั้นเติมชาดำ ชาดำผสมกระเจี๊ยบแดงในอัตราส่วนต่างๆ และกระเจี๊ยบแดง ทิ้งไว้ 15 นาที เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ทิ้งไว้ให้เย็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบ่งใส่ขวดหมักปริมาตร 350 มิลลิลิตรต่อโหล เติมหหัวเชื้อบริสุทธิ์ตามอัตราส่วนที่ได้จากการศึกษาใน  
ขั้นต้น ปิดโหลหมักด้วยผ้าขาวบางที่ผ่านการฆ่าเชื้อบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 วัน

**ตารางที่ 3.2** อัตราส่วนของชาดำและกระเจี๊ยบแดงที่ใช้เป็นวัตถุดิบในกระบวนการหมักคอมบูชา

อัตราส่วน (ร้อยละ)	
ชาดำ	กระเจี๊ยบแดง
1	0
0.9	0.1
0.8	0.2
0.7	0.3
0.6	0.4
0.5	0.5
0	1

ทำการเก็บตัวอย่างวันที่ 0 3 7 9 และ 10 โดยเตรียมตัวอย่างที่ใช้ในการ  
วิเคราะห์ 3 ซ้ำ วิเคราะห์คุณภาพทางเคมี คุณภาพทางจุลินทรีย์ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด  
สารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด สารแอนโทไซยานินทั้งหมด กิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ และ  
ทดสอบการยอมรับของผู้บริโภค เลือกอัตราส่วนของชาดำต่อกระเจี๊ยบแดงที่มีปริมาณสารต้านอนุมูล  
อิสระ ค่ากิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระสูง และผู้บริโภคยอมรับในรสชาติมาศึกษาในหัวข้อต่อไป

**3.2.7 การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของคอมบูชาในระหว่าง  
กระบวนการหมัก**

#### 3.2.7.1 ค่าพีเอช โดยใช้เครื่อง pH Meter

สอบเทียบค่ามาตรฐานด้วยสารละลายมาตรฐานที่มีค่าพีเอช 4.01 และ 7.00  
ก่อนการวิเคราะห์ ทำการตรวจวัดค่าพีเอช 3 ซ้ำ และหาค่าเฉลี่ย

#### 3.2.7.2 ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติก (AOAC., 2000)

##### 1. การหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลาย NaOH

เตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อ  
ลิตร และเตรียมสารละลายโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลต (KHP) ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร  
ไทเทรตกับสารละลาย NaOH และคำนวณหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลาย NaOH ตาม  
สมการดังนี้

$$C_{\text{NaOH}}V_{\text{NaOH}} = C_{\text{KHP}}V_{\text{KHP}}$$

ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ และหาค่าเฉลี่ยความเข้มข้นที่แน่นอน  
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2. การวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติก

ปิเปตตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร เติมน้ำปราศจากคาร์บอนไดออกไซด์ 45 มิลลิลิตรเพื่อทำการเจือจาง หยดสารฟีนอล์ฟทาลีน 3 หยด และทำการไทเทรตด้วยสารละลาย NaOH ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน บันทึกปริมาตรสารละลาย NaOH ที่ทำให้สารละลายตัวอย่างเปลี่ยนเป็นสีชมพู (จุดยุติ) คำนวณปริมาณกรดอะซิติกในตัวอย่างตามสมการ ดังนี้

$$\text{ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติก (ร้อยละ)} = \frac{C \times V \times M.W. \times 100}{(1000 \times \text{ปริมาณของสารตัวอย่าง})}$$

โดย C คือ ความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลาย NaOH (โมลต่อลิตร)

V คือ ปริมาตรของสารละลาย NaOH ที่ใช้ในการไทเทรตจนถึงจุดยุติ (มิลลิลิตร)

M.W คือ มวลโมเลกุลของกรดอะซิติก มีค่าเท่ากับ 60.052 กรัมต่อโมล

ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ และหาค่าเฉลี่ย

### 3.2.7.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total Sugar) ด้วยวิธีฟีนอล-ซัลฟูริก (Phenol-Sulphuric) (Dubois *et al.*, 1956)

#### 1. การสร้างกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

เตรียมสารละลายกลูโคสความเข้มข้น 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอลความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร โดยปล่อยกรดลงบนผิวหน้าของสารโดยตรง ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วจึงทำการเขย่า และตั้งทิ้งไว้อีก 30 นาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ใช้น้ำกลั่นเป็นแบลนค์ในการทดสอบ เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร) (แกน X) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร (แกน Y) และหาสมการเส้นตรง  $y = ax$

#### 2. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

ทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยปิเปตตัวอย่าง 1.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายฟีนอลความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร โดยปล่อยกรดลงบนผิวหน้าของสารโดยตรง ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วจึงทำการเขย่า และตั้งทิ้งไว้อีก 30 นาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่างเป็นแบลนค์ (Blank) ในการทดสอบ คำนวณปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดจากสมการเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร ดังสมการ

$$\text{ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)} = A_{490} / B$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดย  $A_{490}$  = คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร  
 B = คือ ค่าความชันจากกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างละ 3 ซ้ำและหาค่าเฉลี่ย

### 3.2.7.4 การวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ โดยใช้เครื่อง Gas – Chromatograph (GC)

#### 1. สภาพที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ของตัวอย่างคอมบูชา

##### 1.1 Inlet

1.1.1 Inlet mode: Split

1.1.2 Inlet Temperature: 150 °C

1.1.3 Pressure: 87.1 kPa

1.1.4 Split ratio: 100 : 1

1.1.5 Split flow: 3 mL/min

1.1.6 Total flow: 244.1 mL/min

1.1.7 Carrier gas: Helium gas

1.2 Column: Capillary column (DB-1) 5  $\mu$ m, 30.0 m  $\times$  0.32 mm.ID

1.2.1 Oven temperature: 60 °C

1.2.2 Column mode: Constant flow

1.2.3 Initial flow: 0.5 mL/min

##### 1.3 Detector

1.3.1 Detector temperature: 180 °C

1.3.2 Hydrogen flow: 30.0 mL/min

1.3.3 Air flow: 350.0 mL/min

1.3.4 Make up gas: Nitrogen gas

1.3.5 Make up flow: 35.0 mL/min

#### 2. การสร้างกราฟมาตรฐานของปริมาณแอลกอฮอล์

สร้างสมการเส้นตรงเพื่อหาความเข้มข้นของเอทานอลมาตรฐานโดยเตรียมสารละลายแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ให้มีความเข้มข้นร้อยละ 0 0.25 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 3.0 ปีเปตสารแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ที่เจือจางแล้วลงในขวดสำหรับฉีดตัวอย่าง (Vial) 500 ไมโครลิตร เติมสารละลายเจือจางโพพานอลความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร 500 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เขย่าให้เข้ากัน สร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟของเอทานอลต่อโพรพานอลกับความเข้มข้นของเอทานอลมาตรฐาน และหาสมการเส้นตรงจากกราฟ

### 3. การวิเคราะห์ตัวอย่าง

ปิเปตสารตัวอย่าง 500 ไมโครลิตร ลงในขวดสำหรับฉีดตัวอย่าง เติมน้ำละลายเจือจางโพรพานอลความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร ปริมาณ 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทำการวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ที่มีในตัวอย่างโดยใช้เครื่อง GC โดยใช้สมการเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟของเอทานอลต่อโพรพานอลกับความเข้มข้นของเอทานอลมาตรฐาน ปริมาณแอลกอฮอล์ที่วิเคราะห์ได้ในตัวอย่างรายงานในหน่วยร้อยละ ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ และหาค่าเฉลี่ย

#### 3.2.7.5 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu method ดัดแปลงมาจาก Chidambara *et al.*, (2002)

##### 1. การสร้างกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid)

เตรียมสารละลายกรดแกลลิกที่มีความเข้มข้น 50 100 150 200 250 300 350 400 450 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปตสารละลายกรดแกลลิกในแต่ละความเข้มข้น 20 ไมโครลิตร เติมน้ำละลายเจือจาง Folin-Ciocalteu reagent ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที เติมน้ำละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 7.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร 80 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate Reader ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร โดยทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ และหาค่าเฉลี่ย นำค่าที่วัดได้สร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (แกน X) และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร (แกน Y) และหาสมการเส้นตรงจากกราฟ

##### 2. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

ปิเปตตัวอย่างคอมบูชา 20 ไมโครลิตร เติมน้ำละลาย Folin-Ciocalteu reagent ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที เติมน้ำละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 7.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร 80 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate Reader ที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ทดสอบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ นำค่าที่ได้คำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแกลลิกดังสมการ

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (ไมโครกรัมสมมูลแกลลิกต่อมิลลิลิตรคอมบูชา)

$$= (A_{765} / B) \times C$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ และหาค่าเฉลี่ย

### 3.2.7.7 การวิเคราะห์ปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมด ด้วยวิธี pH Differential (Amaya-Cruz *et al.*, 2019)

ปิเปตตัวอย่างเจือจาง 50 ไมโครลิตรลงใน 96 well-plate เติมสารละลาย บัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตต ความเข้มข้น 0.4 โมลาร์ (ค่าพีเอช 4.5) 175 ไมโครลิตร เขย่าให้สารเข้ากัน บ่มสาร 30 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 และ 700 นาโนเมตร ปิเปตตัวอย่างเจือจาง 50 ไมโครลิตรลงใน 96 well-plate เติมสารละลายบัฟเฟอร์โพแทสเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.025 โมลาร์ (ค่าความเป็นพีเอช 1.0) 175 ไมโครลิตร เขย่าให้สารเข้ากัน บ่มสาร 30 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 และ 700 นาโนเมตร ใช้น้ำกลั่นเป็นแปลงค์ในการวิเคราะห์ นำค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้มาคำนวณในสูตรดังนี้ ปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมด (มิลลิกรัม/ลิตรของคอมบูชา)

$$= (A \times MW \times DF) / (\epsilon \times D)$$

โดย A คือ ผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 และ 700 นาโนเมตร คำนวณได้จาก

$$A = (A_{510} - A_{700})_{\text{pH 1.0}} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH 4.5}}$$

MW คือ มวลโมเลกุลของสารไซยาตินิน-3-กลูโคไซด์ เท่ากับ 484.8 กรัมต่อโมล

DF คือ จำนวนเท่าในการเจือจางตัวอย่าง

$\epsilon$  คือ ค่าสัมประสิทธิ์ของการดูดกลืนแสงของสารไซยาตินิน-3-กลูโคไซด์ เท่ากับ 26900 ลิตรต่อโมลต่อเซนติเมตร

D คือ ความสูงของสารใน well plate

ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ และหาค่าเฉลี่ย

### 3.2.7.8 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging ดัดแปลงจาก Blois, (1958) และ Chan *et al.*, (2011)

#### 1. การสร้างกราฟมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid)

เจือจางกรดแอสคอร์บิกความเข้มข้น 0 0.01 0.02 0.03 0.04 0.05 0.06 0.07 0.08 0.09 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (mg/mL) ปิเปตตัวอย่าง 50 ไมโครลิตรลงใน 96 well-plate เติมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมล ที่ละลายในเอทานอล 150 ไมโครลิตร เขย่าให้สารละลายเข้ากัน บ่มสารในที่มีเป็นเวลา 30 นาที วัดการลดลงของอนุมูลอิสระ DPPH ที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ทำการคำนวณกิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของกรดแอสคอร์บิก ตามสมการ

กิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระของกรดแอสคอร์บิก (ร้อยละ)

$$= [ (\Delta A_{\text{control}} - \Delta A_{\text{sample}}) / \Delta A_{\text{control}} ] \times 100$$

โดย  $\Delta A_{\text{control}}$  = ผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายอนุมูลอิสระ DPPH กับเอทานอล  
คำนวณจาก  $A_{\text{control}} - \text{Blank}_{\text{control}}$

$\Delta A_{\text{sample}}$  = ผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงของกรดแอสคอร์บิกเจือจางที่ถูกกระตุ้นด้วย  
สารละลาย DPPH กับกรดแอสคอร์บิกเจือจาง คำนวณจาก

$$A_{\text{sample}} - \text{Blank}_{\text{sample}}$$

นำค่าที่ได้สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิก (mg/mL) (แกน X) กับ กิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ (ร้อยละ) (แกน Y) สร้างสมการความสัมพันธ์เพื่อหาค่าปริมาณความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิก (mg/mL) ที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 ( $y = 50$ ) (Inhibitory concentration 50 :  $IC_{50}$ )

## 2. การวิเคราะห์ฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ

เจือจางตัวอย่างคอมบูชาด้วยน้ำกลั่น ปีเปิดตัวอย่างที่เจือจางแล้ว 50 ไมโครลิตร ลงใน 96 well-plate เติมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมล ที่ละลายในเอทานอล 150 ไมโครลิตร เขย่าให้สารละลายเข้ากัน บ่มสารในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที วัดการลดลงของอนุมูลอิสระ DPPH ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ทำการคำนวณกิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ตามสมการ

กิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ (ร้อยละ) =  $[ (\Delta A_{\text{control}} - \Delta A_{\text{sample}}) / \Delta A_{\text{control}} ] \times 100$

โดย  $\Delta A_{\text{control}}$  = ผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายอนุมูลอิสระ DPPH กับเอทานอล  
คำนวณจาก  $A_{\text{control}} - \text{Blank}_{\text{control}}$

$\Delta A_{\text{sample}}$  = ผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงของคอมบูชาเจือจางที่ถูกกระตุ้นด้วย  
สารละลาย DPPH กับตัวอย่างคอมบูชาเจือจาง คำนวณจาก

$$A_{\text{sample}} - \text{Blank}_{\text{sample}}$$

นำค่าที่ได้สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของคอมบูชา (mL/mL) (แกน X) กับกิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ (ร้อยละ) (แกน Y) สร้างสมการความสัมพันธ์เพื่อหาค่าปริมาณความเข้มข้นของคอมบูชาที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 ( $y = 50$ ) (Inhibitory concentration 50 :  $IC_{50}$ )

### 3. เปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของคอมบูชากับสาร

#### มาตรฐาน

โดยคำนวณจากสูตร

$$\text{Ascorbic acid Equivalent Antioxidant Capacity (AEAC)} = \frac{\text{IC}_{50} \text{ Ascorbic acid}}{\text{IC}_{50} \text{ kombucha}} \text{ (mg Ascorbic acid/mL kombucha)}$$

#### 3.2.7.9 ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) ดัดแปลงจาก Re *et al.*, (1999) และ Cardoso *et al.*, (2020)

โดยใช้สาร ABTS หรือ 2, 2'-azino-bis radical สารสังเคราะห์ที่มีสีเขียวแกมน้ำเงิน สามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร

การเตรียมอนุมูล ABTS<sup>o+</sup>

ผสมสารละลาย ABTS ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์กับสารโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต 2.45 มิลลิโมลาร์ ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 บ่มสารไว้เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลาย ABTS<sup>o+</sup> เจือจางด้วยน้ำกลั่น วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ให้ค่าการดูดกลืนแสงอยู่ที่  $0.70 \pm 0.02$

#### 1. การสร้างกราฟมาตรฐานสารโทรลอคซ์ (Trolox)

เจือจางสารโทรลอคซ์ความเข้มข้น 0 0.005 0.01 0.015 0.02 0.025 และ 0.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (mg/mL) ปิดเตตัวอย่าง 50 ไมโครลิตรลงใน 96 well-plate เติมสารอนุมูล ABTS<sup>o+</sup> 150 ไมโครลิตร เขย่าให้สารละลายเข้ากัน บ่มสารในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที วัดการลดลงของอนุมูลอิสระ ABTS<sup>o+</sup> ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ทำการคำนวณกิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารโทรลอคซ์ ตามสมการ

กิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารโทรลอคซ์ (ร้อยละ)

$$= [ (\Delta A_{\text{control}} - \Delta A_{\text{sample}}) / \Delta A_{\text{control}} ] \times 100$$

โดย  $\Delta A_{\text{control}}$  = ผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายอนุมูลอิสระ ABTS<sup>o+</sup> กับน้ำกลั่น  
คำนวณจาก  $A_{\text{control}} - \text{Blank}_{\text{control}}$

$\Delta A_{\text{sample}}$  = ผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงของสารโทรลอคซ์เจือจางที่ถูกกระตุ้นด้วยอนุมูล ABTS<sup>o+</sup> กับสารโทรลอคซ์เจือจาง คำนวณจาก

$$A_{\text{sample}} - \text{Blank}_{\text{sample}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำค่าที่ได้สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารโทรลอกซ์ (mg/mL) (แกน X) กับ กิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ (ร้อยละ) (แกน Y) สร้างสมการความสัมพันธ์ เพื่อหาค่าปริมาณความเข้มข้นของสารโทรลอกซ์ (mg/mL) ที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 ( $y = 50$ ) (Inhibitory concentration 50 :  $IC_{50}$ )

## 2. การวิเคราะห์ฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ

เจือจางตัวอย่างคอมบูชาด้วยน้ำกลั่น ปีเปิดตัวอย่างที่เจือจางแล้ว 50 ไมโครลิตรลงใน 96 well-plate เติมสารอนุมูล ABTS<sup>o+</sup> ปริมาตร 150 ไมโครลิตร เขย่าให้สารละลายเข้ากัน บ่มสารในที่มีดเป็นเวลา 30 นาที วัดการลดลงของอนุมูลอิสระ ABTS<sup>o+</sup> ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ทำการคำนวณกิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS<sup>o+</sup> ตามสมการ

$$\text{กิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ (ร้อยละ)} = [ (\Delta A_{\text{control}} - \Delta A_{\text{sample}}) / \Delta A_{\text{control}} ] \times 100$$

โดย  $\Delta A_{\text{control}}$  = ผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายอนุมูลอิสระ ABTS<sup>o+</sup> กับน้ำกลั่น  
คำนวณจาก  $A_{\text{control}} - \text{Blank}_{\text{control}}$

$\Delta A_{\text{sample}}$  = ผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงของคอมบูชาเจือจางที่ถูกกระตุ้นด้วยอนุมูล ABTS<sup>o+</sup> กับตัวอย่างคอมบูชาเจือจาง คำนวณจาก  
 $A_{\text{sample}} - \text{Blank}_{\text{sample}}$

นำค่าที่ได้สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของคอมบูชา (mL/mL) (แกน X) กับกิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ (ร้อยละ) (แกน Y) สร้างสมการความสัมพันธ์ เพื่อหาค่าปริมาณความเข้มข้นของคอมบูชาที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 ( $y = 50$ ) (Inhibitory concentration 50 :  $IC_{50}$ )

## 3. เปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของคอมบูชากับสาร

มาตรฐาน

โดยคำนวณจากสูตร

$$\text{Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC)} = \frac{IC_{50} \text{ Trolox}}{IC_{50} \text{ kombucha}}$$

(mg Trolox/mL kombucha)

### 3.2.8 การวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์ในระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชา

ทำการตรวจสอบปริมาณเชื้อแบคทีเรียอะซิติกและยีสต์ที่มีอยู่ โดยปีเปิดตัวอย่างคอมบูชา 0.1 มิลลิลิตรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วทำการ Spread plate ตรวจวัดปริมาณเชื้อแบคทีเรียอะซิติก โดยใช้อาหาร GYC agar และตรวจวัดปริมาณเชื้อยีสต์โดยใช้อาหาร DRBC agar บ่มจานอาหารที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ทำการตรวจนับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญบนจานอาหาร รายงานในหน่วย cfu/mL

จากการทดลองข้างต้น คัดเลือกอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างการใช้ชาดำผสมกระเจี๊ยบแดง (มีฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระสูงเมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน และมีการยอมรับของผู้บริโภค) เพื่อนำมาศึกษาการทำผลิตภัณฑ์คอมบูชาในลักษณะผงแห้ง

### 3.2.9 ศึกษาปริมาณมอลโตเด็กซ์ทรินที่เหมาะสมในการทำผงแห้งของเครื่องดื่มคอมบูชา

นำคอมบูชากรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมครอน จากนั้นนำมาทำแห้งด้วยวิธี Freeze dried ดัดแปลงวิธีของ Rocha-Parra *et al.*, (2016) โดยนำคอมบูชาผสมมอลโตเด็กซ์ทริน (maltodextrin) ซึ่งเป็นสารช่วยทำแห้ง แปรผันปริมาณมอลโตเด็กซ์ทรินเป็นร้อยละ 10 15 20 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร นำตัวอย่างคอมบูชาไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างเข้าเครื่อง Freeze dried ที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 40 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้ไปบดเป็นผง นำผลิตภัณฑ์คอมบูชาที่ได้วิเคราะห์ค่าต่างๆ เช่น ค่า Water activity ( $a_w$ ) และความชื้น จากนั้นนำคอมบูชาผงละลายด้วยน้ำกลั่น นำมาวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีทางจุลินทรีย์ และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ รวมทั้งการทดสอบทางประสาทสัมผัส

### 3.2.10 การคำนวณค่าความสามารถในการรักษาสารประกอบชีวภาพ (Estupinan-Amaya *et al.*, 2020)

ความสามารถในการรักษาสารประกอบชีวภาพ (ร้อยละ) ของตัวอย่างหลังกระบวนการ Freeze dried สามารถคำนวณจากสูตร

ความสามารถในการรักษาสารประกอบชีวภาพ (ร้อยละ) =  $(L_c / L_o) \times 100$

โดย  $L_c$  คือ ปริมาณสารประกอบชีวภาพหลังการทำแห้ง

$L_o$  คือ ปริมาณสารประกอบชีวภาพก่อนทำแห้ง

### 3.2.11 การทดสอบทางประสาทสัมผัส

ทำการทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยนำคอมบูชาจากชาดำผสมกระเจี๊ยบ หมักด้วยอัตราส่วนเชื้อแบคทีเรียอะซิติกและยีสต์ที่เหมาะสม ที่มีค่ากิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS<sup>+</sup> สูง มาทดสอบทางประสาทสัมผัส โดยใช้ผู้ทดสอบเป็นนักศึกษาที่มีอายุระหว่าง 18 – 25 ปี ทดสอบในลักษณะการให้คะแนนทางประสาทสัมผัสในด้านความใส สี กลิ่น รสชาติ และความชอบโดยรวมด้วยวิธี 9-point Hedonic Scale ซึ่งมีคะแนนอยู่ที่ 1 – 9 คะแนน โดย 1 คือไม่ชอบเลย 2 คือไม่ชอบมาก 3 คือไม่ชอบปานกลาง 4 คือไม่ชอบเล็กน้อย 5 คือเฉยๆ 6 คือชอบเล็กน้อย 7 คือชอบปานกลาง 8 คือชอบมาก 9 คือชอบเป็นพิเศษ แล้วนำคะแนน

การประเมินทุกด้านวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 25.0 ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

### 3.2.12 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) มี 3 ซ้ำ นำผลการทดลองวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS วิเคราะห์ความแปรปรวนด้วย ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่างของแต่ละชุดการทดลองด้วย Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

### 4.1 ผลการศึกษาปริมาณแบคทีเรียอะซิติกและยีสต์ทั้งหมดในหัวเชื้อคอมบูชาทางการค้า

ปริมาณเชื้อแบคทีเรียอะซิติกและยีสต์ทั้งหมดในหัวเชื้อคอมบูชาทางการค้าที่หมักในอาหารชาดำหวานเป็นเวลา 10 วัน พบว่าเชื้อแบคทีเรียอะซิติกมีปริมาณมากกว่าเชื้อยีสต์ทั้งในส่วนของแผ่นเซลล์ูโลส (Pellicle) และในส่วนของน้ำหมัก (Broth) อีกทั้งในแผ่นเซลล์ูโลสมีปริมาณเชื้อต่ำกว่าในน้ำหมัก โดยในแผ่นเซลล์ูโลสมีเชื้อแบคทีเรียอะซิติกเฉลี่ยเท่ากับ  $5.63 \pm 0.04$  Log CFU/g มีเชื้อยีสต์เฉลี่ยเท่ากับ  $4.95 \pm 0.04$  Log CFU/g และในน้ำหมักมีเชื้อแบคทีเรียอะซิติกเฉลี่ยเท่ากับ  $6.32 \pm 0.01$  Log CFU/mL มีเชื้อยีสต์เฉลี่ยเท่ากับ  $5.85 \pm 0.04$  log CFU/mL ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Zhao *et al.*, (2018) รายงานว่าคอมบูชาจากชาผู้เออร์ (Pu-erh) มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียอะซิติกมากกว่าเชื้อยีสต์ตลอดระยะเวลาการหมัก Goh *et al.*, (2012) และ Chen and Liu, (2000) ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในแผ่นเซลล์ูโลสและน้ำหมักคอมบูชาจากชาดำ พบว่ามีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในแผ่นเซลล์ูโลสน้อยกว่าในน้ำหมัก เนื่องจากแผ่นเซลล์ูโลสจะสร้างขึ้นในช่วงตั้งแต่วันที่ 3 หรือ 4 หลังจากเติมหัวเชื้อคอมบูชาเต็ม ทำให้เซลล์จุลินทรีย์ส่วนใหญ่เจริญในน้ำหมักก่อนและบางส่วนจะถูกตรึงอยู่กับแผ่นเซลล์ูโลส โดยเฉพาะแบคทีเรียอะซิติกที่มีความสามารถในการสร้างเส้นใยเซลล์ูโลส

### 4.2 ความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสง (Optical density) กับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์

ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรสัมพันธ์กับปริมาณของเชื้อแบคทีเรียอะซิติก *Acetobacter pasteurianus* AJ605 และ เชื้อยีสต์ *Zygosaccharomyces bailii* YN403 แสดงดังสมการ  $y = 11.206x + 0.3312$  ( $R^2 = 0.9946$ ) และ  $y = 0.9547x + 5.6842$  ( $R^2 = 0.999$ ) ตามลำดับ ทำการคำนวณค่า OD. ที่ต้องการจากสมการ เตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์โดยการเจือจางและวัดค่า OD. ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

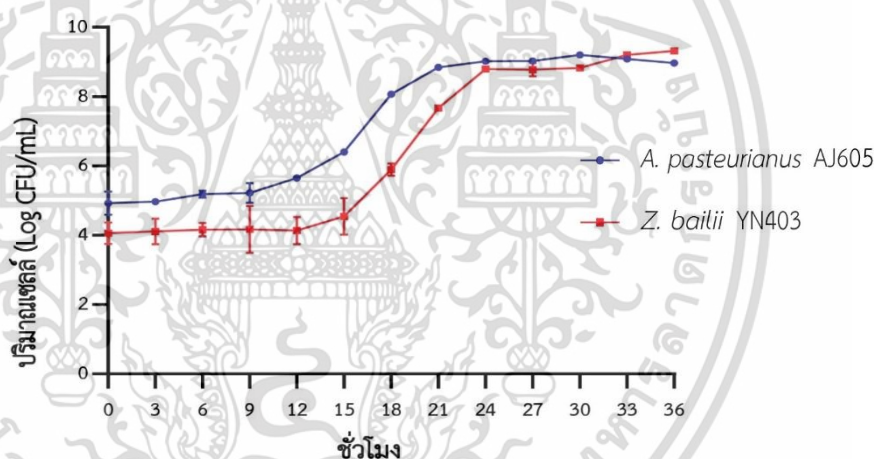
### 4.3 การเจริญของเชื้อ *Acetobacter pasteurianus* AJ605 และ *Zygosaccharomyces bailii* YN403 ในชาดำหวาน

ลักษณะการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *A. pasteurianus* AJ605 และเชื้อยีสต์ *Z. bailii* YN403 ในอาหารชาดำหวาน แสดงดังรูปที่ 4.1 โดยเชื้อ *A. pasteurianus* AJ605 มีช่วงระยะพักตัว (Lag phase) อยู่ในชั่วโมงที่ 0 – 9 มีปริมาณเชื้อ  $4.93 \pm 0.33$  ถึง  $5.22 \pm 0.29$  Log CFU/mL หลังจากนั้นเข้าสู่ระยะแบ่งตัวทวีคูณ (Log phase) โดยจุด Log phase สูงสุดอยู่ในชั่วโมงที่ 21 มีปริมาณเชื้อ  $8.84 \pm 0.01$  Log CFU/mL หลังจากนั้น *A. pasteurianus* AJ605 จะเข้าสู่ระยะคงตัว (Stationary phase) ในขณะที่เชื้อ *Z. bailii* YN403 มีช่วงระยะพักอยู่ในชั่วโมงที่ 0 – 12 มีปริมาณเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.06±0.31 ถึง 4.14±0.39 Log CFU/mL หลังจากนั้นได้เข้าสู่ Log phase โดยจุดสูงสุดอยู่ที่ชั่วโมงที่ 24 มีปริมาณเชื้อ 8.80±0.01 Log CFU/mL และเข้าช่วง Stationary phase

เชื้อ *A. pasteurianus* AJ605 มีช่วง Log phase อยู่ในชั่วโมงที่ 12 - 18 ซึ่งสั้นกว่าเชื้อ *Z. bailii* YN403 ที่มีช่วง Log phase อยู่ในชั่วโมงที่ 15 - 24 อาจเนื่องมาจากในอาหารซาดำหวาน ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งเชื้อยีสต์ *Z. bailii* เป็นเชื้อในกลุ่ม non-saccharomyces มีความสามารถในการใช้น้ำตาลซูโครส โดยการหลั่งเอนไซม์อินเวอร์เทส (Invertase) ออกมาย่อยน้ำตาลซูโครสได้เป็นน้ำตาลกลูโคสและฟรุคโตส สำหรับให้เซลล์นำไปใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึม (Bellut *et al.*, 2018) นอกจากนี้การเพิ่มจำนวนของเชื้อ *A. pasteurianus* AJ605 ในอาหารซาดำหวาน แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน สอดคล้องกับ Biyik and Coban (2017) รายงานถึงความสามารถในการใช้น้ำตาลซูโครสของเชื้อ *A. pasteurianus* HBB6 โดยสามารถผลิตเซลล์ได้ ในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน แต่มีปริมาณเซลล์เกิดขึ้นน้อยกว่าเมื่อเทียบกับอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบ ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนหลักที่เชื้อสามารถใช้ได้



รูปที่ 4.1 ลักษณะการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *A. pasteurianus* AJ605 และเชื้อยีสต์ *Z. bailii* YN403 ในอาหารซาดำหวาน

4.4 ผลการศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของเชื้อ *A. pasteurianus* AJ605 และ *Z. bailii* YN403 ในการหมักคอมบูชา

4.4.1 การเปลี่ยนแปลงของเชื้อ *A. pasteurianus* AJ605 และ *Z. bailii* YN403

ในระหว่างกระบวนการหมัก

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในอาหารซาดำหวาน โดยเตรียมเชื้อแบคทีเรีย *A. pasteurianus* AJ605 และ *Z. bailii* YN403 เลี้ยงในอาหารซาดำหวานเป็นเวลา 24 ชม. และปรับความเข้มข้นเซลล์ให้ใกล้เคียงกับหัวเชื้อทางการค้า ทำการเติมเชื้อแบคทีเรียและยีสต์

ในอัตราส่วนต่างๆ หมักเป็นเวลา 10 วัน ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียและยีสต์แสดงดังเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.2 อัตราส่วนที่เติมเชื้อแบคทีเรีย *A. pasteurianus* AJ605 ชนิดเดียว (B10Y0) มีการเพิ่มจำนวนอย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลาการหมัก โดยพบว่าในวันที่ 10 มีปริมาณเชื้อสูงสุดซึ่งสูงกว่าวันแรก  $1.86 \pm 0.00$  Log CFU/mL (ตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.2ก) อัตราส่วนที่ใช้เชื้อยีสต์ *Z. bailii* YN403 ชนิดเดียวในการหมัก (B0Y10) เชื้อยีสต์มีการเจริญสูงสุดในวันที่ 3 หลังจากนั้นพบว่ามีจำนวนลดลงเล็กน้อย (ตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.2ข) โดยในวันสุดท้ายของการหมักอัตราส่วน B0Y10 มีปริมาณเชื้อสูงกว่าวันแรก  $1.57 \pm 0.01$  LogCFU/mL การเพิ่มจำนวนของเชื้อแบคทีเรีย *A. pasteurianus* AJ605 และเชื้อยีสต์ *Z. bailii* YN403 ในอาหารชาดำหวาน เนื่องมาจากความสามารถในการใช้น้ำตาลซูโครสของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อยีสต์ (ปิยวรรณ, 2562; Biyik and Coban, 2017) นอกจากนี้ในน้ำชาดำหวานประกอบไปด้วยแหล่งไนโตรเจน เช่น กรดอะมิโน (Naveed *et al.*, 2018) ที่เชื้อจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ในการเจริญของเซลล์ได้

อัตราส่วนผสมระหว่างเชื้อแบคทีเรีย *A. pasteurianus* AJ605 (B) และ *Z. bailii* YN403 (Y) ในอัตราส่วน B8Y2, B6Y4, B5Y5, B4Y6 และ B2Y8 เมื่อทำการหมักเชื้อทั้งสองชนิดร่วมกันพบว่าเชื้อแบคทีเรียมีการเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างต่อเนื่อง และมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดในวันที่ 3 หลังจากนั้นปริมาณของเชื้อแบคทีเรียมีการเพิ่มขึ้นเล็กน้อย

ตารางที่ 4.1 แสดงการเปลี่ยนแปลงของเชื้อแบคทีเรีย *A. pasteurianus* AJ605 ระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชาจากชาดำ หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน

อัตราส่วนเชื้อแบคทีเรียต่อเชื้อยีสต์	ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย <i>A. pasteurianus</i> AJ605 (Log CFU/mL)			
	ระยะเวลาการหมัก (วัน)			
	0	3	7	10
B10Y0	$5.77 \pm 0.01^d$	$6.51 \pm 0.03^c$	$6.83 \pm 0.05^b$	$7.63 \pm 0.01^a$
B8Y2	$5.51 \pm 0.02^d$	$6.73 \pm 0.23^c$	$7.39 \pm 0.00^b$	$7.97 \pm 0.11^a$
B6Y4	$5.23 \pm 0.02^d$	$6.74 \pm 0.03^c$	$7.29 \pm 0.02^b$	$7.40 \pm 0.90^a$
B5Y5	$5.04 \pm 0.02^d$	$6.88 \pm 0.03^c$	$7.26 \pm 0.01^b$	$7.56 \pm 0.04^a$
B4Y6	$4.88 \pm 0.04^c$	$6.77 \pm 0.01^b$	$7.09 \pm 0.10^a$	$7.13 \pm 0.13^a$
B2Y8	$4.66 \pm 0.05^d$	$6.62 \pm 0.01^c$	$7.08 \pm 0.02^b$	$7.20 \pm 0.02^a$

พิจารณาในแถวแนวนอน ตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ในขณะที่เชื้อยีสต์ของทุกอัตราส่วนมีการเจริญสูงสุดในวันที่ 3 เช่นเดียวกับที่พบในเชื้อแบคทีเรีย หลังจากนั้นเชื้อยีสต์มีการลดจำนวนลงในวันที่ 7 และ 10 โดยในวันสุดท้ายของการหมักมีปริมาณเชื้อยีสต์อยู่ในช่วง  $5.43 \pm 0.03$  –  $6.34 \pm 0.02$  Log CFU/mL แสดงดังตารางที่ 4.2

การเพิ่มขึ้นของปริมาณเชื้อแบคทีเรียและเชื้อยีสต์เนื่องมาจากการทำงานร่วมกันระหว่างเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้เผยแพร่โดยไม่เสียค่าใช้จ่าย  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

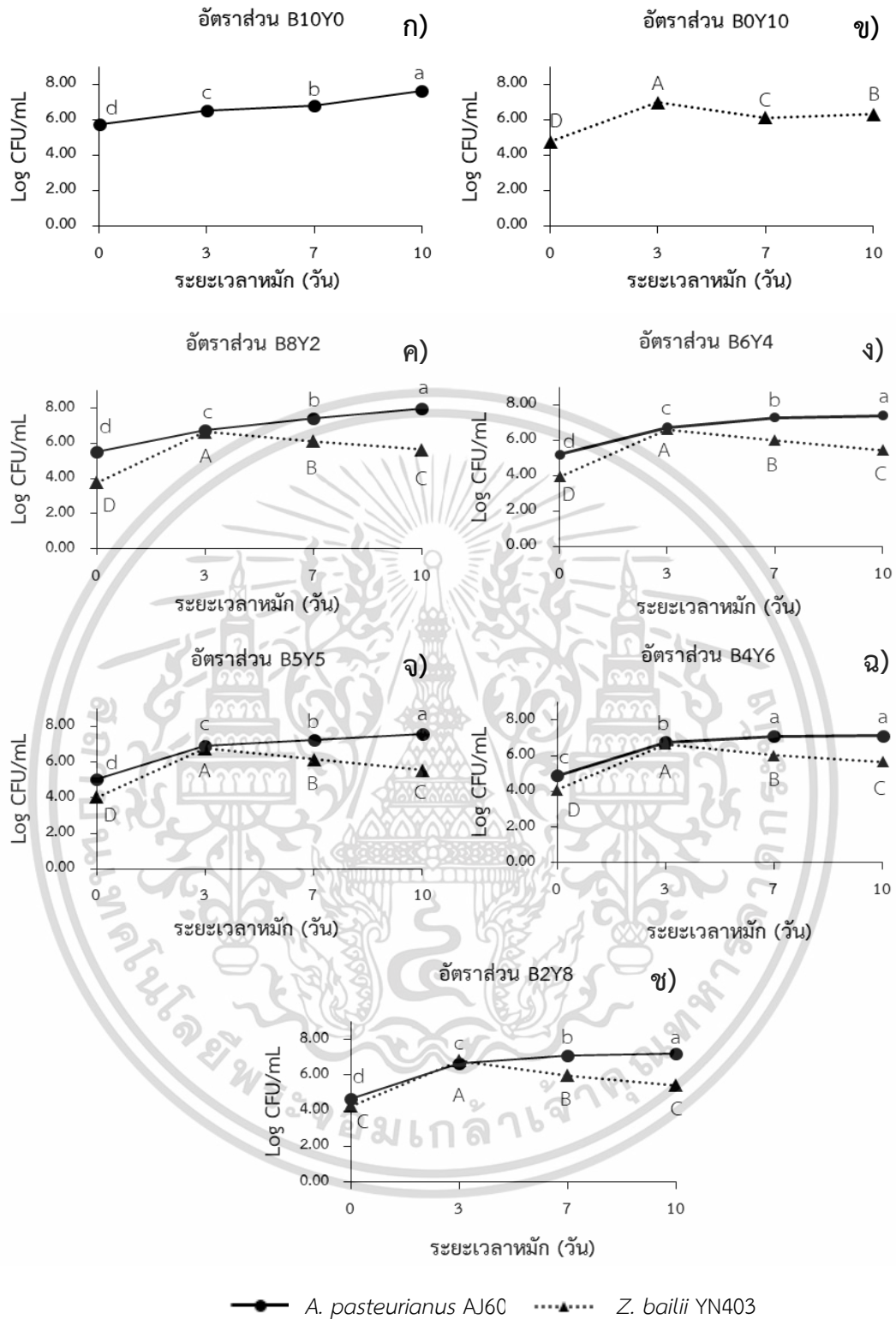
แบคทีเรียและเชื้อยีสต์ในกระบวนการหมัก ซึ่งเป็นลักษณะความสัมพันธ์แบบอยู่ร่วมกัน (Symbiosis) โดยเชื้อยีสต์ *Z. bailii* YN403 มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์อินเวอร์เทสเพื่อย่อยน้ำตาลซูโครส เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวสำหรับให้แบคทีเรีย *A. pasteurianus* AJ605 และเชื้อยีสต์เองนำไปใช้ในการเจริญ อีกทั้งยังสร้างเอทานอลที่แบคทีเรียสามารถนำไปเปลี่ยนเป็นกรดอะซิติกได้ (Jayabalan *et al.*, 2014) ส่งผลให้เชื้อจุลินทรีย์ในการหมักแบบอัตราส่วนผสมมีการเพิ่มจำนวนขึ้นกว่าวันแรกของการหมัก

ตารางที่ 4.2 แสดงการเปลี่ยนแปลงของเชื้อยีสต์ *Z. bailii* YN403 ระหว่างกระบวนการหมัก คอมบูชาจากชาดำ หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน

อัตราส่วนเชื้อ แบคทีเรียต่อเชื้อยีสต์	ปริมาณเชื้อยีสต์ <i>Z. bailii</i> YN403 (Log CFU/mL)			
	ระยะเวลาการหมัก (วัน)			
	0	3	7	10
B8Y2	3.75±0.03 <sup>d</sup>	6.65±0.03 <sup>a</sup>	6.11±0.10 <sup>b</sup>	5.64±0.06 <sup>c</sup>
B6Y4	3.97±0.01 <sup>d</sup>	6.62±0.04 <sup>a</sup>	6.03±0.04 <sup>b</sup>	5.46±0.01 <sup>c</sup>
B5Y5	4.02±0.02 <sup>d</sup>	6.76±0.00 <sup>a</sup>	6.15±0.02 <sup>b</sup>	5.55±0.07 <sup>c</sup>
B4Y6	4.08±0.15 <sup>d</sup>	6.66±0.02 <sup>a</sup>	6.02±0.16 <sup>b</sup>	5.65±0.05 <sup>c</sup>
B2Y8	4.27±0.05 <sup>d</sup>	6.79±0.05 <sup>a</sup>	5.98±0.02 <sup>b</sup>	5.43±0.03 <sup>c</sup>
B0Y10	4.77±0.12 <sup>d</sup>	6.98±0.02 <sup>a</sup>	6.13±0.01 <sup>c</sup>	6.34±0.02 <sup>b</sup>

พิจารณาในแถวแนวนอน ตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

แบคทีเรีย *A. pasteurianus* AJ605 มีความสามารถในการใช้น้ำตาลได้หลากหลาย ทั้งน้ำตาลซูโครส ฟรุคโตส และกลูโคส รวมไปถึงเอทานอล (Zheng *et al.*, 2018; Mamlouk and Gullo, 2013; Biyik and Coban, 2017) ทำให้เกิดการแข่งขันในเรื่องการใช้สารอาหารกับเชื้อยีสต์ ส่งผลให้เมื่อเวลาหมักเพิ่มมากขึ้นเชื้อยีสต์มีจำนวนลดลงหลังวันที่ 3 อีกทั้งในกระบวนการหมักเชื้อแบคทีเรีย *A. pasteurianus* AJ605 มีการสร้างแผ่นฝ้าอยู่ที่หน้าอาหาร ทำให้อากาศไม่สามารถแพร่ผ่านได้สม่ำเสมอ อาจส่งผลให้เชื้อยีสต์ *Z. bailii* YN403 ที่เจริญได้เข้าไปในสภาวะไร้อากาศค่อยๆ ลดจำนวนลง สอดคล้องกับงานวิจัยของ Rodrigues *et al.*, (2001) รายงานว่าสภาวะการหมักแบบไร้อากาศส่งผลให้ยีสต์ *Z. bailii* มีอัตราการเจริญที่ต่ำมาก และจำกัดการเพิ่มจำนวนเซลล์ของเชื้อ



รูปที่ 4.2 การเปลี่ยนแปลงของเชื้อแบคทีเรีย *A. pasteurianus* AJ605 (B) และเชื้อยีสต์ *Z. bailii* YN403 (Y) ระหว่างกระบวนการหมักในอาหารชาดำหวาน ก) B10Y0: ชุดการทดลองที่ใช้เฉพาะแบคทีเรีย, ข) B0Y10: ชุดการทดลองที่ใช้เฉพาะยีสต์, ค) - ช): ชุดการทดลองที่ใช้หัวเชื้อแบคทีเรียกับยีสต์ผสมในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.4.2 ผลการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางเคมีระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชาด้วยอัตราส่วนเชื้อที่แตกต่างกัน

##### 4.4.2.1 ค่าพีเอช และปริมาณกรดทั้งหมด

ค่าพีเอชในทุกอัตราส่วนเชื้อมีค่าลดลงตามระยะเวลาการหมักแสดงดังรูปที่ 4.3 โดยในวันที่ 10 คอมบูชาที่หมักด้วยหัวเชื้อทางการค้า คอมบูชาที่หมักด้วยอัตราส่วนที่เติมเชื้อแบคทีเรีย *A. pasteurianus* AJ605 อย่างเดียว (B10Y0) และคอมบูชาที่หมักด้วยอัตราส่วนที่เติมเชื้อยีสต์ *Z. bailii* YN403 (B0Y10) อย่างเดียว มีค่าพีเอชอยู่ที่  $2.62 \pm 0.10$ ,  $2.65 \pm 0.09$  และ  $2.71 \pm 0.24$  ตามลำดับ ซึ่งมีค่าต่ำกว่าค่าพีเอชในคอมบูชาที่ใช้อัตราส่วนเชื้อผสม ในวันสุดท้ายของการหมักอัตราส่วนเชื้อผสม B8Y2 B6Y4 B5Y5 B4Y6 และ B2Y8 มีค่าพีเอช  $3.16 \pm 0.07$ ,  $3.13 \pm 0.13$ ,  $3.12 \pm 0.16$ ,  $3.04 \pm 0.11$  และ  $3.02 \pm 0.08$  ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.3

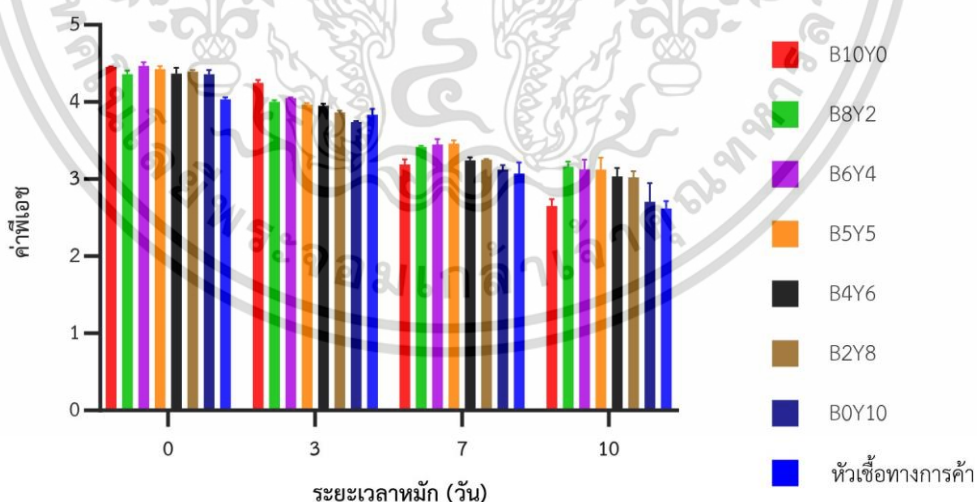
ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติกเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมักในทุกอัตราส่วนของเชื้อ (รูปที่ 4.4) สอดคล้องกับค่าพีเอชที่ลดลง โดยวันสุดท้ายของการหมักอัตราส่วน B10Y0 มีปริมาณกรดสูงสุด  $8.59 \pm 0.15$  กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.4) ซึ่งเกิดจากความสามารถในการผลิตกรดได้สูงของเชื้อแบคทีเรีย *A. pasteurianus* AJ605 (ปิยวรรณ, 2562) รองลงมาคืออัตราส่วน B0Y10 มีปริมาณกรด  $7.78 \pm 0.67$  กรัมต่อลิตร โดยมีรายงานถึงความสามารถในการผลิตกรดอินทรีย์หลายชนิดของเชื้อ *Z. bailii* (Xu *et al.*, 2017) ซึ่งส่งผลให้ปริมาณกรดเพิ่มสูงขึ้นและพีเอชมีค่าลดลง อัตราส่วนเชื้อผสมของแบคทีเรียและยีสต์มีปริมาณกรดอยู่ในช่วง  $7.00 \pm 0.59$  –  $7.63 \pm 0.06$  กรัมต่อลิตร โดยพบว่าปริมาณกรดทั้งหมดต่ำกว่าอัตราส่วนที่ใช้เชื้อเดี่ยว B10Y0 และ B0Y10 เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์สามารถใช้กรดอินทรีย์บางส่วนเป็นแหล่งคาร์บอนและเป็นซับสเตรตเสริมในการสร้างสาร acetyl-CoA ในกระบวนการ TCA (Chen *et al.*, 2000; Rodrigues *et al.*, 2012) นอกจากนั้นปริมาณกรดเพิ่มสูงขึ้นตามอัตราส่วนของยีสต์ที่เติมในกระบวนการหมัก (ตารางที่ 4.4) เกิดจากแอลกอฮอล์ที่ได้จากการหมักของยีสต์ถูกออกซิไดซ์โดยแบคทีเรียเกิดเป็นกรดอะซิติก (Jayabalan *et al.*, 2014) และความสามารถในการสร้างกรดอินทรีย์ของเชื้อ *Z. bailii* จากรายงานของ Xu *et al.*, (2017) เชื้อ *Z. bailii* สามารถผลิตกรดอินทรีย์ได้ 6 ชนิดในระหว่างกระบวนการหมักเครื่องดื่มและผลิตกรดอะซิติกได้สูงกว่าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae*

นอกจากนี้ยังพบว่าค่าพีเอชและปริมาณกรดทั้งหมดของอัตราส่วนเชื้อผสมแบคทีเรียและยีสต์มีค่าต่ำกว่าคอมบูชาที่หมักด้วยหัวเชื้อทางการค้า เนื่องจากในหัวเชื้อทางการค้าประกอบด้วยเชื้อแบคทีเรียและยีสต์หลายชนิด เช่น แบคทีเรีย *Gluconacetobacter* sp. *Acetobacter xylinum* ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* *Zygosaccharomyces* sp. เป็นต้น ซึ่งมีความสามารถในการใช้น้ำตาลและผลิตกรดอินทรีย์ในระหว่างกระบวนการหมักได้อย่างต่อเนื่อง (Jayabalan *et al.*, 2014)

ตารางที่ 4.3 ค่าพีเอชในคอมบูชาจากชาดำหมักด้วยเชื้อ *A. pasteurianus* AJ605 และ *Z. bailii* YN403 อัตราส่วนที่ต่างกัน หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน

อัตราส่วนเชื้อ แบคทีเรียต่อเชื้อยีสต์	ค่าพีเอช			
	ระยะเวลาการหมัก (วัน)			
	0	3	7	10
B10Y0	4.46±0.01 <sup>A,a</sup>	4.25±0.04 <sup>A,b</sup>	3.19±0.07 <sup>BCD,c</sup>	2.65±0.09 <sup>B,d</sup>
B8Y2	4.36±0.05 <sup>B,a</sup>	4.00±0.02 <sup>BC,b</sup>	3.42±0.01 <sup>A,c</sup>	3.16±0.07 <sup>A,d</sup>
B6Y4	4.47±0.05 <sup>A,a</sup>	4.05±0.01 <sup>B,b</sup>	3.45±0.07 <sup>A,c</sup>	3.13±0.13 <sup>A,d</sup>
B5Y5	4.43±0.04 <sup>AB,a</sup>	3.96±0.02 <sup>C,b</sup>	3.46±0.04 <sup>A,c</sup>	3.12±0.16 <sup>A,d</sup>
B4Y6	4.37±0.08 <sup>B,a</sup>	3.95±0.03 <sup>C,b</sup>	3.24±0.04 <sup>BC,c</sup>	3.04±0.11 <sup>A,d</sup>
B2Y8	4.39±0.02 <sup>AB,a</sup>	3.86±0.02 <sup>D,b</sup>	3.25±0.01 <sup>B,c</sup>	3.02±0.08 <sup>A,d</sup>
B0Y10	4.36±0.05 <sup>B,a</sup>	3.74±0.01 <sup>E,b</sup>	3.12±0.06 <sup>CD,c</sup>	2.71±0.24 <sup>B,d</sup>
หัวเชื้อทางการค้า	4.04±0.03 <sup>C,a</sup>	3.84±0.08 <sup>D,b</sup>	3.07±0.14 <sup>D,c</sup>	2.62±0.10 <sup>B,d</sup>

- พิจารณาในแถวแนวดิ่ง ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
- พิจารณาในแถวแนวนอน ตัวอักษรพิมพ์เล็กต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



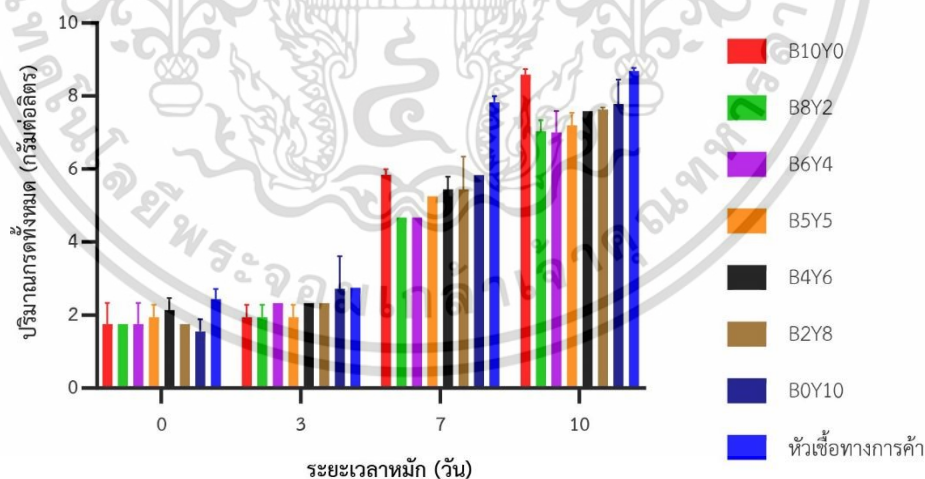
รูปที่ 4.3 ค่าพีเอชในคอมบูชาจากชาดำหมักด้วยเชื้อ *A. pasteurianus* AJ605 และ *Z. bailii* YN403 อัตราส่วนที่ต่างกัน หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร) ของคอมบูชาจากชาดำหมักด้วยเชื้อ *A. pasteurianus* AJ605 และ *Z. bailii* YN403 อัตราส่วนที่ต่างกัน หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน

ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)				
อัตราส่วนเชื้อ แบคทีเรียต่อเชื้อยีสต์	ระยะเวลาการหมัก (วัน)			
	0	3	7	10
B10Y0	1.75±0.58 <sup>AB,c</sup>	1.94±0.33 <sup>B,c</sup>	5.85±1.50 <sup>B,b</sup>	8.59±0.15 <sup>A,a</sup>
B8Y2	1.75±0.00 <sup>AB,c</sup>	1.94±0.33 <sup>B,c</sup>	4.67±0.00 <sup>C,b</sup>	7.03±0.31 <sup>C,a</sup>
B6Y4	1.75±0.58 <sup>AB,c</sup>	2.33±0.00 <sup>AB,c</sup>	4.67±0.00 <sup>C,b</sup>	7.00±0.59 <sup>C,a</sup>
B5Y5	1.94±0.033 <sup>AB,c</sup>	1.94±0.33 <sup>B,c</sup>	5.25±0.00 <sup>BC,b</sup>	7.20±0.34 <sup>BC,a</sup>
B4Y6	2.14±0.33 <sup>AB,c</sup>	2.33±0.00 <sup>AB,c</sup>	5.45±0.34 <sup>B,b</sup>	7.59±0.00 <sup>BC,a</sup>
B2Y8	1.75±0.00 <sup>AB,c</sup>	2.33±0.00 <sup>AB,c</sup>	5.45±0.89 <sup>B,b</sup>	7.63±0.06 <sup>BC,a</sup>
B0Y10	1.56±0.33 <sup>B,d</sup>	2.72±0.89 <sup>A,c</sup>	5.84±0.00 <sup>B,b</sup>	7.78±0.68 <sup>B,a</sup>
หัวเชื้อทางการค้า	2.43±0.28 <sup>A,c</sup>	2.74±0.00 <sup>A,c</sup>	7.83±0.17 <sup>A,b</sup>	8.69±0.82 <sup>A,a</sup>

- พิจารณาในแถวแนวดิ่ง ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
- พิจารณาในแถวแนวนอน ตัวอักษรพิมพ์เล็กต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



รูปที่ 4.4 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร) ระหว่างกระบวนการหมักในอาหารชาดำหวานที่เติมเชื้อแบคทีเรีย *A. pasteurianus* AJ605 และ เชื้อยีสต์ *Z. bailii* YN403 อัตราส่วนที่ต่างกัน หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.4.2.2 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณแอลกอฮอล์

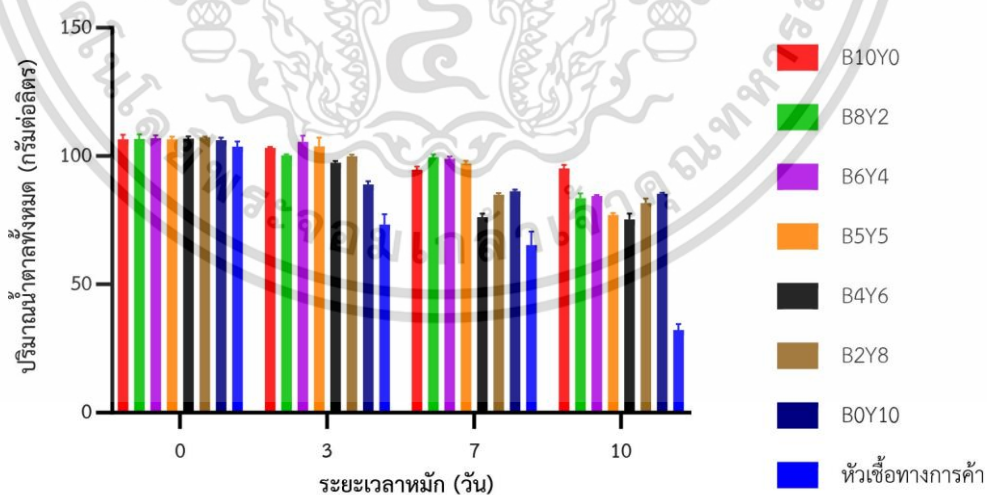
คอมบูชาหมักด้วยอัตราส่วนเชื้อที่แตกต่างกันมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในวันแรกของการหมักอยู่ในช่วง 106.15 – 107.27 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.5) การเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในระหว่างกระบวนการหมักแสดงดังรูปที่ 4.5 ปริมาณน้ำตาลลดลงตลอดระยะเวลาการหมักในทุกอัตราส่วนของเชื้อ สอดคล้องกับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้น โดยปริมาณน้ำตาลคงเหลือในวันสุดท้ายของอัตราส่วนที่ใช้เชื้อแบคทีเรียอย่างเดี่ยว (B10Y0) และ ใช้เชื้อยีสต์อย่างเดี่ยว (B0Y10) มีค่า  $95.15 \pm 1.39$  และ  $85.34 \pm 0.34$  กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเชื้อยีสต์ *Z. bailii* YN403 มีความสามารถในการใช้น้ำตาลได้ดีกว่าเชื้อแบคทีเรีย *A. pasteurianus* AJ605 สำหรับคอมบูชาที่หมักด้วยเชื้อผสม B8Y2 B6Y4 B5Y5 B4Y6 และ B2Y8 มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในวันสุดท้ายของการหมักดังนี้  $83.55 \pm 1.86$   $84.49 \pm 0.27$   $77.05 \pm 0.75$   $75.33 \pm 2.17$  และ  $81.66 \pm 1.78$  กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในอัตราส่วนเชื้อผสมมีปริมาณน้อยกว่าในอัตราเชื้อเดี่ยว แสดงให้เห็นว่าในอัตราส่วนเชื้อผสมมีการใช้น้ำตาลสูงกว่า สอดคล้องกับงานวิจัยของ Wang *et al.*, (2020) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในการหมักคอมบูชาด้วยเชื้อแบคทีเรีย *A. pasteurianus* และ *Gluconacetobacter xylinus* ร่วมกับ *Z. bailii* เป็นเวลา 10 วัน พบว่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 2 หลังจากนั้นลดลงอย่างช้าๆ ตลอดระยะเวลาการหมัก เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ทั้งสามชนิดมีความสามารถในการใช้น้ำตาลซูโครสได้นอกจากนี้เมื่อเทียบกับคอมบูชาทางการค้า คอมบูชาจากเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้มีปริมาณน้ำตาลในวันที่ 10 สูงกว่าคอมบูชาทางการค้า อาจเนื่องมาจากความหลากหลายของเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ในหัวเชื้อคอมบูชาทางการค้า ซึ่งส่งผลให้กระบวนการหมักคอมบูชาทางการค้าสามารถใช้น้ำตาลได้มากกว่า

ปริมาณแอลกอฮอล์ในกระบวนการหมักมีค่าเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการหมัก (รูปที่ 4.6) สอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ลดลงเนื่องจากยีสต์ใช้ในการผลิตแอลกอฮอล์จากรายงานของ Gaggia *et al.*, 2018 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเคมีในคอมบูชาจากชาดำ ชาเขียว และชาอู่หลง เป็นเวลา 14 วัน พบว่าปริมาณแอลกอฮอล์เพิ่มสูงขึ้นตลอดระยะเวลาการหมัก พร้อมกับปริมาณน้ำตาลมีค่าลดลง จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเชื้อยีสต์ *Z. bailii* YN403 มีการใช้น้ำตาลเพื่อสร้างแอลกอฮอล์ขึ้นระหว่างกระบวนการหมัก ในวันสุดท้ายของการหมักอัตราส่วนเชื้อ B8Y2 B6Y4 B5Y5 B4Y6 B2Y8 และ B0Y10 มีปริมาณแอลกอฮอล์  $7.96 \pm 0.10$   $8.25 \pm 0.08$   $8.15 \pm 0.03$   $9.61 \pm 0.03$   $10.76 \pm 0.09$  และ  $10.69 \pm 0.05$  กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 4.6 ปริมาณแอลกอฮอล์จะเพิ่มขึ้นตามอัตราส่วนของเชื้อยีสต์ *Z. bailii* YN403 ที่เติมลงไปในการหมักหมัก ส่งผลให้อัตราส่วนเชื้อผสม B8Y2 มีปริมาณแอลกอฮอล์ต่ำสุดในวันสุดท้ายของการหมัก

ตารางที่ 4.5 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร) ในคอมบูชาจากชาดำหมักด้วยเชื้อ *A. pasteurianus* AJ605 และ *Z. bailii* YN403 อัตราส่วนที่แตกต่างกัน หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน

อัตราส่วนเชื้อ	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)			
	ระยะเวลาการหมัก (วัน)			
แบคทีเรียต่อเชื้อยีสต์	0	3	7	10
B10Y0	106.58±1.79 <sup>A,a</sup>	103.21±0.29 <sup>AB,b</sup>	94.73±1.20 <sup>B,c</sup>	95.15±1.39 <sup>A,c</sup>
B8Y2	106.64±1.84 <sup>A,a</sup>	100.34±0.30 <sup>BC,b</sup>	99.59±1.09 <sup>A,b</sup>	83.55±1.86 <sup>BC,c</sup>
B6Y4	106.98±1.05 <sup>A,a</sup>	105.58±2.30 <sup>A,a</sup>	98.89±0.96 <sup>A,b</sup>	84.49±0.27 <sup>BC,c</sup>
B5Y5	106.52±1.05 <sup>A,a</sup>	103.79±3.35 <sup>AB,a</sup>	97.07±1.18 <sup>AB,b</sup>	77.05±0.75 <sup>D,c</sup>
B4Y6	106.85±0.88 <sup>A,a</sup>	97.42±0.68 <sup>C,b</sup>	76.17±1.33 <sup>D,c</sup>	75.33±2.18 <sup>C,c</sup>
B2Y8	107.27±0.30 <sup>A,a</sup>	99.91±0.64 <sup>BC,b</sup>	84.99±0.60 <sup>C,c</sup>	81.66±1.78 <sup>C,d</sup>
B0Y10	106.15±1.04 <sup>A,a</sup>	88.90±1.28 <sup>D,b</sup>	86.31±0.61 <sup>C,c</sup>	85.34±0.34 <sup>B,c</sup>
หัวเชื้อทางการค้า	103.72±1.91 <sup>B,a</sup>	73.30±4.07 <sup>D,b</sup>	65.25±5.31 <sup>E,c</sup>	32.15±2.48 <sup>E,d</sup>

- พิจารณาในแถวแนวนอน ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
- พิจารณาในแถวแนวนอน ตัวอักษรพิมพ์เล็กต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



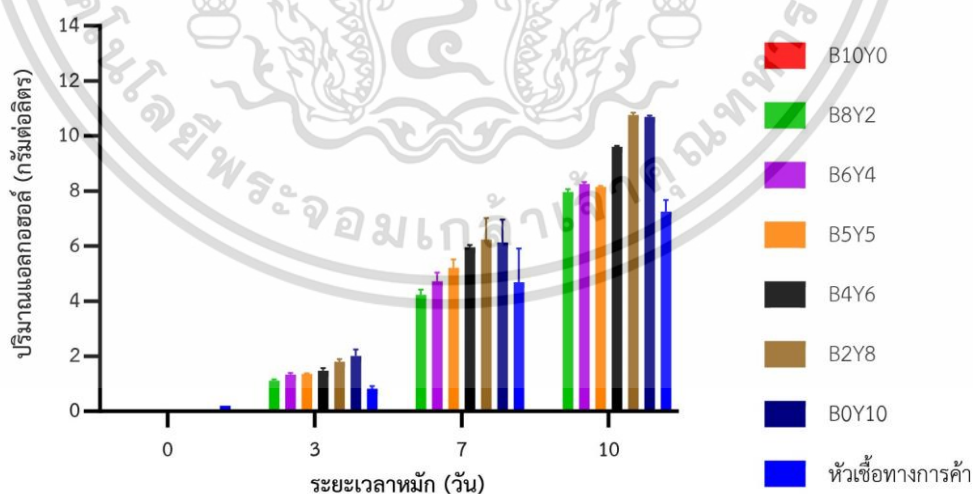
รูปที่ 4.5 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร) ระหว่างกระบวนการหมักในอาหารชาดำหวานที่เติมเชื้อแบคทีเรีย *A. pasteurianus* AJ605 และ เชื้อยีสต์ *Z. bailii* YN403 อัตราส่วนที่แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 ปริมาณแอลกอฮอล์ (กรัมต่อลิตร) ในคอมบูชาจากชาดำหมักด้วยเชื้อ *A. pasteurianus* AJ605 และ *Z. bailii* YN403 อัตราส่วนที่ต่างกัน หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน

อัตราส่วนเชื้อ แบคทีเรียต่อเชื้อยีสต์	ปริมาณแอลกอฮอล์ (กรัมต่อลิตร)			
	ระยะเวลาการหมัก (วัน)			
	0	3	7	10
B10Y0	0.00±0.00 <sup>A,a</sup>	0.00±0.00 <sup>F,a</sup>	0.00±0.00 <sup>C,a</sup>	0.00±0.00 <sup>F,a</sup>
B8Y2	0.00±0.00 <sup>A,d</sup>	1.11±0.05 <sup>D,c</sup>	4.23±0.18 <sup>B,b</sup>	7.96±0.10 <sup>D,a</sup>
B6Y4	0.00±0.00 <sup>A,d</sup>	1.34±0.06 <sup>C,c</sup>	4.71±0.32 <sup>B,b</sup>	8.25±0.08 <sup>C,a</sup>
B5Y5	0.00±0.00 <sup>A,d</sup>	1.36±0.02 <sup>C,c</sup>	5.21±0.30 <sup>AB,b</sup>	8.15±0.03 <sup>CD,a</sup>
B4Y6	0.00±0.00 <sup>A,d</sup>	1.47±0.10 <sup>C,c</sup>	5.95±0.08 <sup>A,b</sup>	9.61±0.03 <sup>B,a</sup>
B2Y8	0.00±0.00 <sup>A,d</sup>	1.80±0.10 <sup>B,c</sup>	6.24±0.78 <sup>A,b</sup>	10.76±0.09 <sup>A,a</sup>
B0Y10	0.00±0.00 <sup>A,d</sup>	2.02±0.23 <sup>A,c</sup>	6.13±0.83 <sup>A,b</sup>	10.69±0.05 <sup>A,a</sup>
หัวเชื้อทางการค้า	0.18±0.03 <sup>B,d</sup>	0.82±0.10 <sup>E,c</sup>	4.68±1.23 <sup>B,b</sup>	7.25±0.42 <sup>E,a</sup>

- พิจารณาในแถวแนวนอน ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
- พิจารณาในแถวแนวนอน ตัวอักษรพิมพ์เล็กต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



รูปที่ 4.6 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอลกอฮอล์ (กรัมต่อลิตร) ระหว่างกระบวนการหมักในอาหารชาดำหวานที่เติมเชื้อแบคทีเรีย *A. pasteurianus* AJ605 และ เชื้อยีสต์ *Z. bailii* YN403 อัตราส่วนที่ต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณแอลกอฮอล์ของคอมบูชาจากเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้มีค่าสูงกว่าคอมบูชาทางการค้า เนื่องมาจากความสามารถในการผลิตแอลกอฮอล์ที่สูงของ *Z. bailii* YN403 (ปิยวรรณ, 2562) นอกจากนี้ในคอมบูชาทางการค้ามีเชื้อแบคทีเรียอะซิติกหลายชนิดที่มีความสามารถในการออกซิไดซ์แอลกอฮอล์เป็นกรดอะซิติก ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณกรดทั้งหมดที่มีค่าสูงกว่าคอมบูชาที่ผลิตจากเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้

#### 4.4.3 สารออกฤทธิ์ชีวภาพและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของคอมบูชาในระหว่างกระบวนการหมัก

##### 4.4.3.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

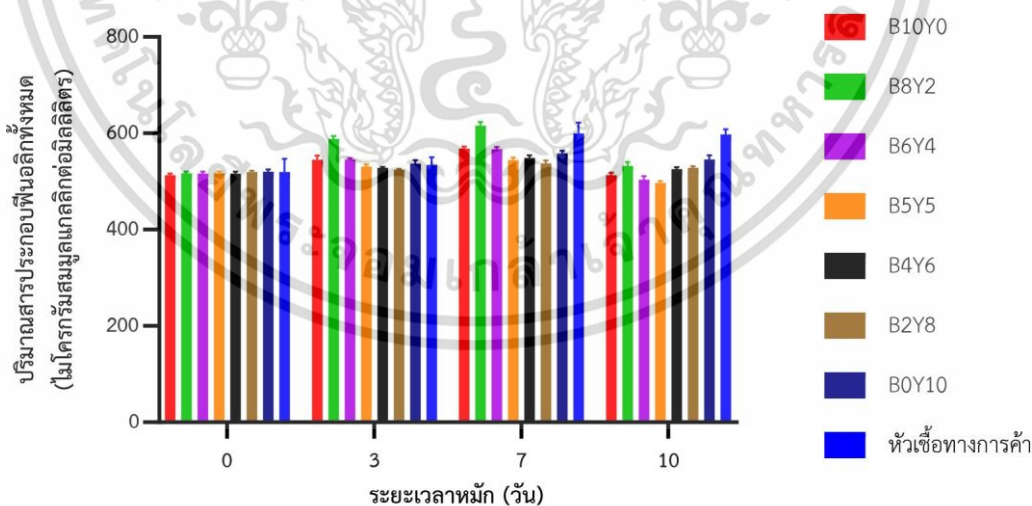
ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในน้ำชาดำหวานที่หมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์อัตราส่วนต่างๆ แสดงดังตารางที่ 4.7 พบว่าทุกอัตราส่วนเชื้อผสมมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุดในวันที่ 7 (รูปที่ 4.7) โดยอัตราส่วนเชื้อผสม B8Y2 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุด เท่ากับ  $625.61 \pm 7.84$  ไมโครกรัมสมมูลแกลลิกต่อมิลลิลิตร รองลงมาเป็นอัตราส่วน B6Y4 มีค่า  $566.78 \pm 4.72$  ไมโครกรัมสมมูลแกลลิกต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นทุกอัตราส่วนเชื้อผสมมีการลดลงของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในวันที่ 10 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Jakubczyk *et al.*, (2020) รายงานปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในคอมบูชาจากชาดำ มีค่าสูงสุดในวันที่ 7 และลดลงในวันที่ 14 ของการหมัก

ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในคอมบูชาจากการใช้เชื้อผสมที่ต่างกันมีค่าสูงสุดในวันที่ 7 ของการหมัก (ตารางที่ 4.8) โดยอัตราส่วนเชื้อผสม B8Y2 มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงที่สุด เท่ากับ  $1216.48 \pm 4.10$  ไมโครกรัมสมมูลเคอเวอซิทินต่อมิลลิลิตร ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) กับคอมบูชาทางการค้า ที่มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด  $1220.22 \pm 4.38$  ไมโครกรัมสมมูลเคอเวอซิทินต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นพบว่ามีการลดลงของปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในทุกอัตราส่วนเชื้อผสม (รูปที่ 4.8) การลดลงของปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในคอมบูชา สอดคล้องกับรายงานของ Wang *et al.*, (2020) โดยคอมบูชาจากชาดำที่หมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์สูงที่สุดในวันที่ 8 และพบการลดลงในวันที่ 10 ของการหมัก

ตารางที่ 4.7 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (ไมโครกรัมสมมูลแกลลิกต่อมิลลิลิตร) ในคอมบูชาจากชาดำหมักด้วยเชื้อ *A. pasteurianus* AJ605 และ *Z. bailii* YN403 อัตราส่วนที่แตกต่างกัน หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (ไมโครกรัมสมมูลแกลลิกต่อมิลลิลิตร)				
อัตราส่วนเชื้อ แบคทีเรียต่อเชื้อยีสต์	ระยะเวลาการหมัก (วัน)			
	0	3	7	10
B10Y0	513.11±3.23 <sup>A,c</sup>	544.92±8.72 <sup>BC,b</sup>	568.53±3.99 <sup>B,a</sup>	513.18±5.12 <sup>D,c</sup>
B8Y2	516.76±3.59 <sup>A,d</sup>	588.48±5.85 <sup>A,b</sup>	625.61±7.84 <sup>A,a</sup>	545.72±8.64 <sup>B,c</sup>
B6Y4	516.40±3.99 <sup>A,c</sup>	545.60±2.50 <sup>B,b</sup>	566.78±4.72 <sup>B,a</sup>	503.63±7.16 <sup>DE,d</sup>
B5Y5	517.12±4.14 <sup>A,c</sup>	530.86±5.08 <sup>CD,b</sup>	544.22±5.27 <sup>CD,a</sup>	497.11±3.62 <sup>E,d</sup>
B4Y6	516.15±4.13 <sup>A,c</sup>	528.13±1.95 <sup>D,b</sup>	549.09±5.54 <sup>CD,a</sup>	525.42±4.40 <sup>C,b</sup>
B2Y8	519.68±2.41 <sup>A,c</sup>	524.09±1.88 <sup>D,bc</sup>	537.65±5.99 <sup>D,a</sup>	528.26±3.73 <sup>C,b</sup>
B0Y10	520.40±4.53 <sup>A,c</sup>	537.08±7.24 <sup>BCD,b</sup>	558.63±5.25 <sup>BC,a</sup>	532.48±7.77 <sup>C,b</sup>
หัวเชื้อทางการค้า	519.97±26.82 <sup>A,b</sup>	534.35±16.14 <sup>BCD,b</sup>	599.60±22.75 <sup>A,a</sup>	597.37±10.88 <sup>A,a</sup>

- พิจารณาในแถวแนวตั้ง ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
- พิจารณาในแถวแนวนอน ตัวอักษรพิมพ์เล็กต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



รูปที่ 4.7 การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (ไมโครกรัมสมมูลแกลลิกต่อมิลลิลิตร) ระหว่างกระบวนการหมักในอาหารชาดำหวานที่เติมเชื้อแบคทีเรีย *A. pasteurianus* AJ605 และ เชื้อยีสต์ *Z. bailii* YN403 อัตราส่วนที่แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเพิ่มขึ้นของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการหมัก (Jakubczyk *et al.*, 2020; Chakravorty *et al.*, 2016) โดยเชื้อจุลินทรีย์มีการสร้างเอนไซม์รวมไปถึงกรดอินทรีย์ออกมาภายนอกเซลล์ ทำให้เกิดการสลายหรือทำลายโครงสร้างสารประกอบฟีนอลิกและสารประกอบฟลาโวนอยด์ขนาดใหญ่ ส่งผลให้ปริมาณสารทั้งสองชนิดมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น (Chakravorty *et al.*, 2016) ขณะเดียวกันเมื่อเกิดการย่อยสลายส่งผลให้โครงสร้างสารเปลี่ยนแปลงไป หรือมีขนาดเล็กลงจนไม่สามารถตรวจพบได้ด้วยวิธีวิเคราะห์แบบเดิม ทำให้ปริมาณสารที่วัดได้มีค่าลดลง (Jayabalan *et al.*, 2007)

ตารางที่ 4.8 ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (ไม่โครกรัมสมมูลควอซีทินต่อมิลลิลิตร) ในคอมบูชา จากชาดำหมักด้วยเชื้อ *A. pasteurianus* AJ605 และ *Z. bailii* YN403 อัตราส่วนที่แตกต่างกันหมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน

ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (ไม่โครกรัมสมมูลควอซีทินต่อมิลลิลิตร)				
อัตราส่วนเชื้อ แบคทีเรียต่อเชื้อ ยีสต์	ระยะเวลาการหมัก (วัน)			
	0	3	7	10
B10Y0	1,024.44±7.52 <sup>B,b</sup>	1,023.70±7.88 <sup>B,b</sup>	1,152.78±4.19 <sup>C,a</sup>	905.93±4.49 <sup>C,c</sup>
B8Y2	1,023.61±5.88 <sup>B,c</sup>	1,069.45±9.24 <sup>A,b</sup>	1,216.48±4.10 <sup>A,a</sup>	993.93±23.63 <sup>B,d</sup>
B6Y4	1,023.34±6.94 <sup>B,c</sup>	1,073.89±3.47 <sup>A,b</sup>	1,185.74±9.76 <sup>B,a</sup>	855.55±12.62 <sup>C,d</sup>
B5Y5	1,024.81±2.80 <sup>B,c</sup>	1,069.44±16.02 <sup>A,b</sup>	1,170.37±11.88 <sup>B,a</sup>	840.57±9.31 <sup>C,d</sup>
B4Y6	1,024.26±6.10 <sup>B,c</sup>	1,061.67±10.84 <sup>A,b</sup>	1,186.30±18.64 <sup>B,a</sup>	831.84±11.03 <sup>C,d</sup>
B2Y8	1,023.63±2.74 <sup>B,b</sup>	1,031.85±3.94 <sup>B,b</sup>	1,137.96±9.25 <sup>C,a</sup>	851.11±5.85 <sup>C,c</sup>
B0Y10	1,028.89±4.19 <sup>B,a</sup>	1,018.89±5.88 <sup>B,b</sup>	988.89±4.84 <sup>D,c</sup>	854.26±4.46 <sup>C,d</sup>
หัวเชื้อทางการค้า	1,053.33±18.27 <sup>A,c</sup>	1,088.89±31.80 <sup>A,c</sup>	1,220.22±4.38 <sup>A,a</sup>	1,175.00±24.86 <sup>A,b</sup>

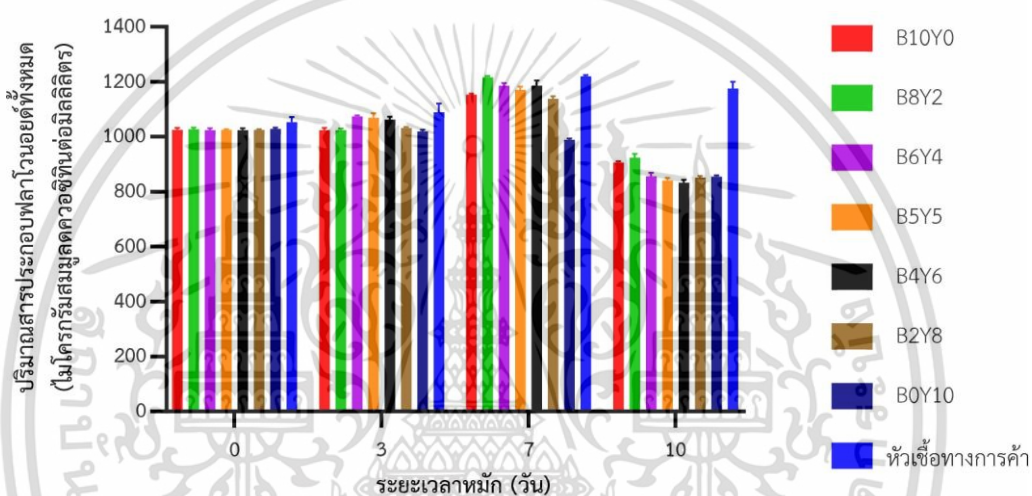
- พิจารณาในแถวแนวตั้ง ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
- พิจารณาในแถวแนวนอน ตัวอักษรพิมพ์เล็กต่าง กันแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากผลการทดลองพบว่าชาดำหวานที่ใช้อัตราส่วนเชื้อผสมระหว่างแบคทีเรีย *A. pasteurianus* AJ605 และยีสต์ *Z. bailii* YN403 ให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงกว่าการใช้เชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อยีสต์หมักเพียงอย่างเดียว

โดยในวันที่ 10 ของการหมักคอมบูชาที่ใช้อัตราส่วนเชื้อ B8Y2 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงกว่าคอมบูชาที่ใช้อัตราส่วนอื่น

#### 4.4.3.2 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS

นำชาดำหวานที่หมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์อัตราส่วนต่างๆ มาวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS โดยรายงานเป็นค่าความเข้มข้นของคอมบูชาที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ได้ร้อยละ 50 (Inhibitory concentration at 50%: IC<sub>50</sub>) ซึ่งเทียบกับสารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิกและสารโพลีฟีนอล ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ 4.9 และ 4.10



รูปที่ 4.8 การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (ไม่โครกรัมสมมูลแอสคอร์บิกต่อมิลลิลิตร) ระหว่างกระบวนการหมักในอาหารชาดำหวานที่เติมหัวเชื้อแบคทีเรีย *A. pasteurianus* AJ605 และ เชื้อยีสต์ *Z. bailii* YN403 อัตราส่วนที่แตกต่างกัน

โดยคอมบูชาที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูง จะมีค่าที่ได้จากการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานสูง จากผลการทดลองพบว่าเมื่อเวลาหมักเพิ่มขึ้นค่า IC<sub>50</sub> เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) (ตารางที่ 4.9 และ 4.10) แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่เพิ่มขึ้นเมื่อเวลาหมักผ่านไป ในวันสุดท้ายของการหมัก IC<sub>50</sub> DPPH ของอัตราส่วนเชื้อผสม B8Y2 มีค่า IC<sub>50</sub> เทียบกับสารมาตรฐานสูงที่สุด  $2.84 \pm 0.21$  มิลลิกรัมสมมูลกรดแอสคอร์บิกต่อมิลลิลิตร ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติกับคอมบูชาที่หมักด้วยหัวเชื้อทางการค้า ( $p > 0.05$ ) รองลงมาเป็นอัตราส่วน B6Y4 มีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ  $2.67 \pm 0.06$  มิลลิกรัมสมมูลกรดแอสคอร์บิกต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีแนวโน้มเดียวกับค่า IC<sub>50</sub> ABTS ของอัตราส่วนเชื้อผสม B8Y2 มีค่าสูงที่สุดเท่ากับ  $2.37 \pm 0.03$  มิลลิกรัมสมมูลโพลีฟีนอลต่อมิลลิลิตร รองลงมาเป็นอัตราส่วน B6Y4 มีค่าเท่ากับ  $2.24 \pm 0.08$  มิลลิกรัมสมมูลโพลีฟีนอลต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่เพิ่มขึ้นเนื่องมาจากเมแทบอลิซึมของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีผลต่อสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Cardoso *et al.*, 2020)

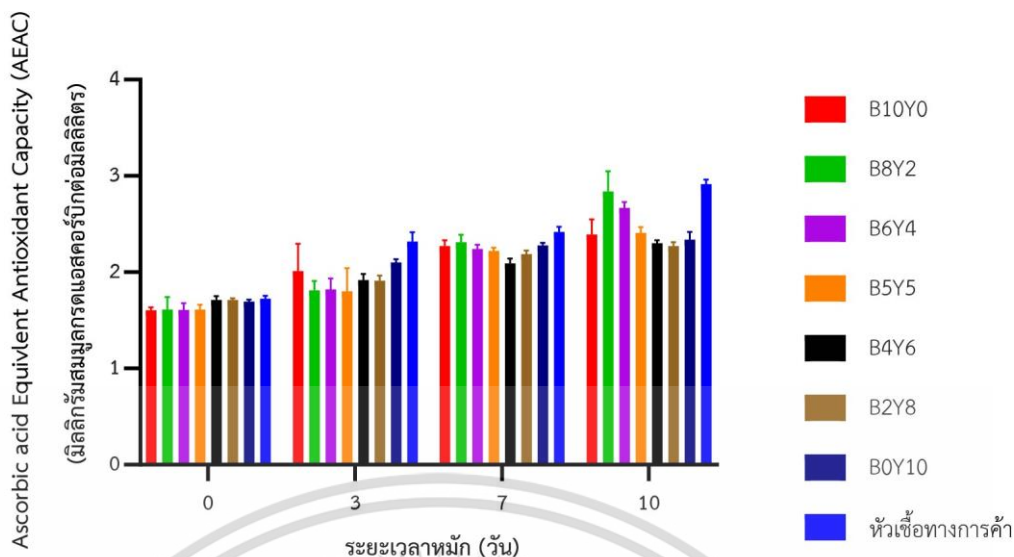
ในวันสุดท้ายของการหมักปริมาณสารฟีนอลิกและสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดมีค่าลดลง ในขณะที่ค่า IC<sub>50</sub> เทียบกับสารมาตรฐานในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS เพิ่มขึ้น อาจเนื่องจากการสลายของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์เป็นไปในลักษณะการเปลี่ยนโครงสร้างให้มีมวลโมเลกุลเล็กลงซึ่งทำให้ไม่สามารถตรวจพบได้โดยวิธีวิเคราะห์เดิม แต่ยังคงผลถึงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่าง (Chu and Chen, 2006) ทำให้ในวันที่ 10 ของการหมักความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS สูงสุด สอดคล้องกับ Jakubczyk *et al.*, (2020) ได้วิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของคอมบูชาจากชาขาว ชาเขียว ชาดำ และชาแดง พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่มีอยู่ในคอมบูชาแต่ละชนิดสอดคล้องกับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และในระหว่างกระบวนการหมักปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดลดลงแต่ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมีค่าสูงขึ้น

**ตารางที่ 4.9** ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (มิลลิกรัมสมมูลกรดแอสคอร์บิกต่อมิลลิลิตร) ของคอมบูชาจากชาดำหมักด้วยเชื้อ *A. pasteurianus* AJ605 และ *Z. bailii* YN403 อัตราส่วนที่แตกต่างกัน หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน

ความเข้มข้นของคอมบูชาที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ร้อยละ 50 (IC <sub>50</sub> ) (มิลลิกรัมสมมูลกรดแอสคอร์บิกต่อมิลลิลิตร)				
อัตราส่วนเชื้อ	ระยะเวลาการหมัก (วัน)			
	0	3	7	10
แบคทีเรียต่อเชื้อยีสต์				
B10Y0	1.60±0.03 <sup>B,c</sup>	2.01±0.28 <sup>BC,b</sup>	2.27±0.06 <sup>BC,ab</sup>	2.39±0.16 <sup>C,a</sup>
B8Y2	1.61±0.13 <sup>AB,c</sup>	1.81±0.09 <sup>C,c</sup>	2.31±0.07 <sup>B,b</sup>	2.84±0.21 <sup>AB,a</sup>
B6Y4	1.61±0.07 <sup>AB,d</sup>	1.82±0.11 <sup>BC,c</sup>	2.24±0.05 <sup>BC,b</sup>	2.67±0.06 <sup>B,a</sup>
B5Y5	1.61±0.05 <sup>AB,b</sup>	1.80±0.24 <sup>C,b</sup>	2.22±0.04 <sup>BC,a</sup>	2.41±0.06 <sup>C,a</sup>
B4Y6	1.71±0.04 <sup>AB,d</sup>	1.92±0.06 <sup>BC,c</sup>	2.09±0.05 <sup>D,b</sup>	2.30±0.03 <sup>C,a</sup>
B2Y8	1.71±0.02 <sup>AB,d</sup>	1.91±0.05 <sup>BC,c</sup>	2.19±0.03 <sup>C,b</sup>	2.27±0.04 <sup>C,a</sup>
B0Y10	1.69±0.02 <sup>AB,c</sup>	2.10±0.04 <sup>AB,b</sup>	2.28±0.03 <sup>BC,a</sup>	2.34±0.08 <sup>C,a</sup>
หัวเชื้อทางการค้า	1.72±0.03 <sup>A,c</sup>	2.32±0.10 <sup>A,b</sup>	2.42±0.05 <sup>A,b</sup>	2.92±0.05 <sup>A,a</sup>

- พิจารณาในแถวแนวตั้ง ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
- พิจารณาในแนวนอน อักษรพิมพ์เล็กต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.9 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (มิลลิกรัมสมมูลกรดแอสคอร์บิกต่อมิลลิลิตร) ของคอมบูชาจากชาดำหมักด้วยเชื้อ *A. pasteurianus* AJ605 และ *Z. bailii* YN403 อัตราส่วนที่แตกต่างกัน

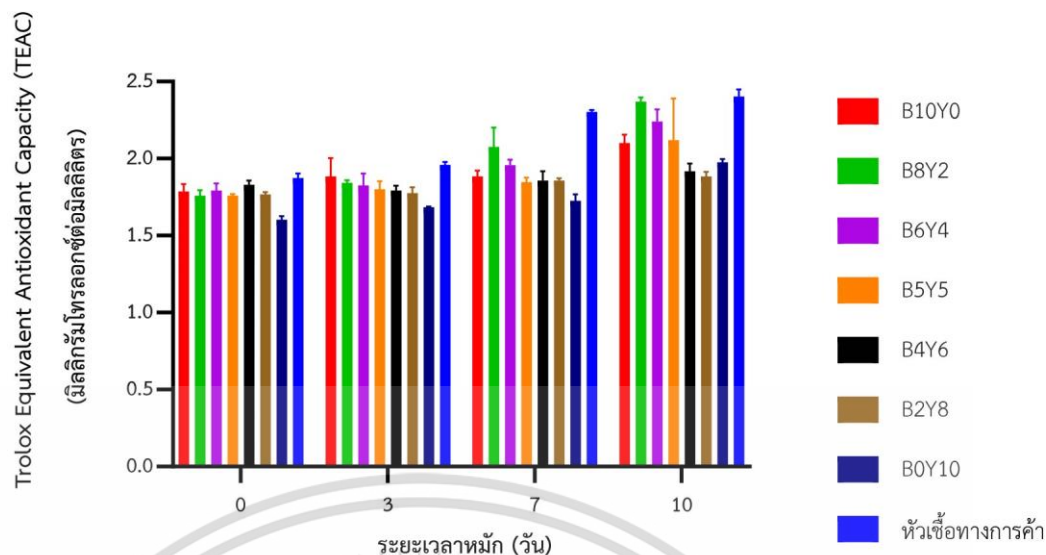
ตารางที่ 4.10 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS (มิลลิกรัมสมมูลโทรลอกซ์ต่อมิลลิลิตร) ของคอมบูชาจากชาดำหมักด้วยเชื้อ *A. pasteurianus* AJ605 และ *Z. bailii* YN403 อัตราส่วนต่างๆ

ความเข้มข้นของคอมบูชาที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ร้อยละ 50 (IC<sub>50</sub>)  
(มิลลิกรัมสมมูลโทรลอกซ์ต่อมิลลิลิตร)

อัตราส่วนเชื้อ	ระยะเวลาการหมัก (วัน)			
	0	3	7	10
แบคทีเรียต่อเชื้อยีสต์				
B10Y0	1.78±0.05 <sup>BC,b</sup>	1.88±0.12 <sup>AB,b</sup>	1.88±0.04 <sup>CD,b</sup>	2.10±0.06 <sup>BCD,a</sup>
B8Y2	1.76±0.03 <sup>C,c</sup>	1.84±0.02 <sup>B,c</sup>	2.08±0.13 <sup>B,b</sup>	2.37±0.03 <sup>A,a</sup>
B6Y4	1.79±0.05 <sup>BC,c</sup>	1.83±0.08 <sup>B,c</sup>	1.96±0.04 <sup>C,b</sup>	2.24±0.08 <sup>AB,a</sup>
B5Y5	1.76±0.01 <sup>C,b</sup>	1.80±0.05 <sup>B,b</sup>	1.85±0.03 <sup>D,b</sup>	2.12±0.27 <sup>BC,a</sup>
B4Y6	1.83±0.03 <sup>AB,b</sup>	1.79±0.03 <sup>B,ab</sup>	1.86±0.06 <sup>CD,ab</sup>	1.92±0.05 <sup>DE,a</sup>
B2Y8	1.77±0.02 <sup>C,b</sup>	1.78±0.04 <sup>BC,b</sup>	1.86±0.02 <sup>CD,a</sup>	1.88±0.03 <sup>E,a</sup>
B0Y10	1.60±0.02 <sup>D,c</sup>	1.68±0.01 <sup>C,b</sup>	1.73±0.04 <sup>E,b</sup>	1.98±0.02 <sup>CDE,a</sup>
หัวเชื้อทางการค้า	1.87±0.03 <sup>A,d</sup>	1.96±0.02 <sup>A,c</sup>	2.30±0.01 <sup>A,b</sup>	2.40±0.05 <sup>A,a</sup>

- พิจารณาในแถวแนวตั้ง ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
- พิจารณาในแถวแนวนอน ตัวอักษรพิมพ์เล็กต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.10 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS (มิลลิกรัมสมมูลโทรลอกซ์ต่อมิลลิกรัม) ของคอมบูซาจากชาดำหมักด้วยเชื้อ *A. pasteurianus* AJ605 และ *Z. bailii* YN403 อัตราส่วนที่แตกต่างกัน

คอมบูซาที่หมักด้วยอัตราส่วนเชื้อผสม B8Y2 มีค่า IC<sub>50</sub> DPPH และ ABTS สูงสุดเนื่องจากในระหว่างกระบวนการหมักชาดำหวานด้วยอัตราส่วนเชื้อ B8Y2 ให้ค่าสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) ซึ่งสารประกอบชีวภาพทั้งสองชนิดที่กล่าวมาเป็นหนึ่งในปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (Jayabalan *et al.*, 2008; Cardoso *et al.*, 2020) ดังนั้นจึงทำการเลือกอัตราส่วนเชื้อผสม B8Y2 คือแบคทีเรีย *A. pasteurianus* AJ605 8 ส่วน ผสมกับเชื้อยีสต์ *Z. bailii* YN403 2 ส่วน โดยมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นในผลิตภัณฑ์ 5.51±0.02 และ 3.75±0.03 Log CFU/mL ตามลำดับ ไปใช้ในการศึกษาต่อไป

#### 4.5 การปรับปรุงคุณภาพของคอมบูซาจากชาดำด้วยกระเจียบแดงในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน

##### 4.5.1 คุณภาพทางเคมีของคอมบูซาในระหว่างกระบวนการหมัก

##### 4.5.1.1 ค่าพีเอช และปริมาณกรดทั้งหมด

เตรียมชาโดยใช้ชาดำ ชาดำผสมกระเจียบในอัตราส่วนต่างๆ และกระเจียบหมักด้วยเชื้อแบคทีเรีย *A. pasteurianus* AJ605 และเชื้อยีสต์ *Z. bailii* YN403 ในอัตราส่วนแบคทีเรียต่อยีสต์ 8:2 (B8Y2) ผลการวิเคราะห์ค่าพีเอชในวันที่ 0 3 7 และ 10 แสดงดังตารางที่ 4.11 ค่าพีเอชเริ่มต้นมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) ตามปริมาณกระเจียบที่ผสมในชาดำ เมื่อเวลาหมักเพิ่มขึ้นค่าพีเอชมีการลดลง (รูปที่ 4.11) โดยในวันสุดท้ายของการหมัก พีเอชของชาดำ (C10R0), ชาดำผสมกระเจียบ (C8R2 C7R3 C6R4 และ C5R5) และชากระเจียบ (C0R10) มีค่าดังนี้ 3.16±0.07 2.61±0.10 2.70±0.08 2.55±0.04 2.47±0.13 และ 2.22±0.04 ตามลำดับ

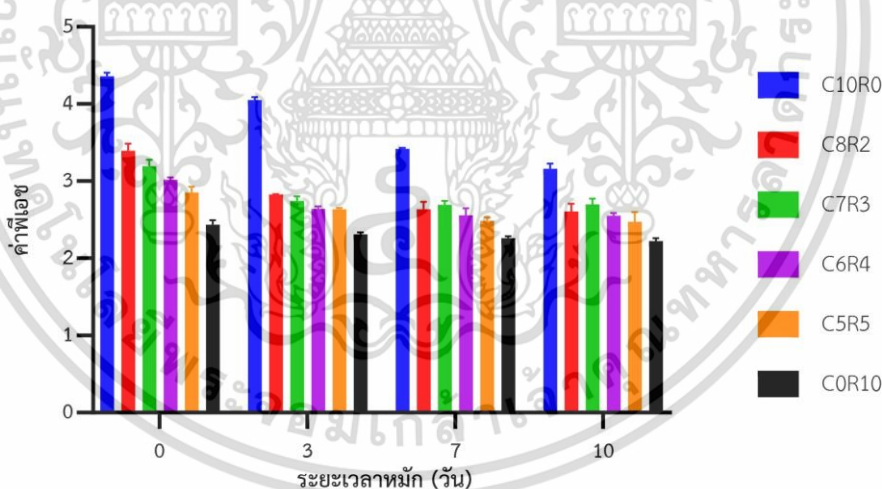
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.11 ค่าพีเอชในคอมบูชาจากชาดำ ชาดำผสมกระเจี๊ยบอัตราส่วนต่างๆ และคอมบูชาจากกระเจี๊ยบ

อัตราส่วนชาดำ ผสมกระเจี๊ยบ	ค่าพีเอช			
	ระยะเวลาการหมัก (วัน)			
	0	3	7	10
C10R0	4.36±0.05 <sup>A,a</sup>	4.05±0.04 <sup>A,b</sup>	3.42±0.01 <sup>A,c</sup>	3.16±0.07 <sup>A,d</sup>
C8R2	3.39±0.09 <sup>B,a</sup>	2.83±0.01 <sup>B,b</sup>	2.64±0.09 <sup>BC,c</sup>	2.61±0.10 <sup>BC,c</sup>
C7R3	3.19±0.09 <sup>C,a</sup>	2.74±0.06 <sup>C,b</sup>	2.69±0.05 <sup>B,b</sup>	2.70±0.08 <sup>B,b</sup>
C6R4	3.02±0.03 <sup>D,a</sup>	2.64±0.03 <sup>D,b</sup>	2.56±0.09 <sup>CD,b</sup>	2.55±0.04 <sup>BC,b</sup>
C5R5	2.85±0.08 <sup>E,a</sup>	2.63±0.02 <sup>D,b</sup>	2.49±0.05 <sup>D,c</sup>	2.47±0.13 <sup>C,c</sup>
C0R10	2.43±0.06 <sup>F,a</sup>	2.31±0.03 <sup>E,b</sup>	2.26±0.03 <sup>E,bc</sup>	2.22±0.04 <sup>D,c</sup>

- พิจารณาในแถวแนวนอน ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
- พิจารณาในแถวแนวนอน ตัวอักษรพิมพ์เล็กต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



รูปที่ 4.11 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในคอมบูชาจากชาดำ ชาดำผสมกระเจี๊ยบ และคอมบูชาจากกระเจี๊ยบ หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน

การเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชในคอมบูชาเป็นผลมาจากปริมาณกรดทั้งหมด โดยจากการวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมด (ตารางที่ 4.12) พบว่าระหว่างกระบวนการหมักปริมาณกรดทั้งหมดมีค่าเพิ่มขึ้นตามปริมาณกระเจี๊ยบที่ได้ผสมลงไป และเมื่อเวลาหมักผ่านไปปริมาณกรดทั้งหมดมีค่าเพิ่มสูงขึ้น (รูปที่ 4.12) ซึ่งอัตราส่วน C10R0 C8R2 C6R4 C5R5 และ C0R10 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณกรดอย่างรวดเร็วในวันที่ 7 หลังจากนั้นปริมาณกรดเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในวันที่ 10

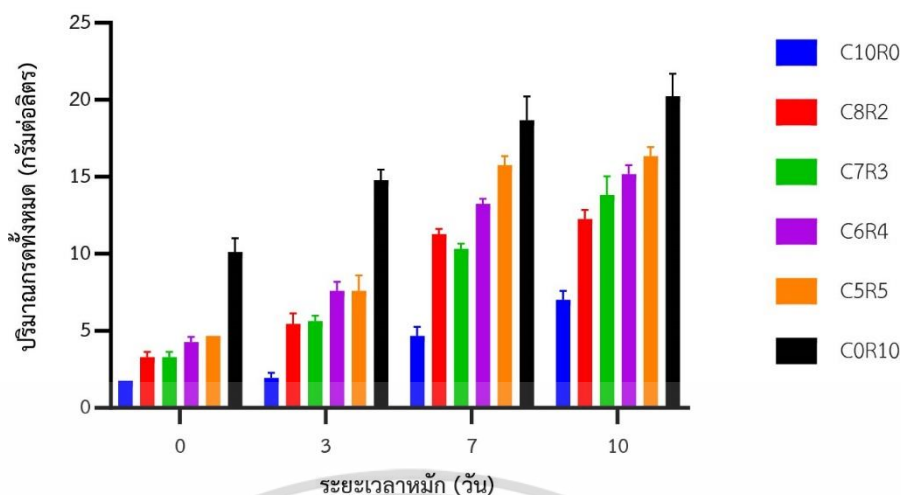
ปริมาณกรดทั้งหมดที่สูงขึ้นและค่าพีเอชที่ลดต่ำในระหว่างกระบวนการหมัก สืบเนื่องจากกระเจียบที่เติมเข้าไป กระเจียบแดงเป็นสมุนไพรที่มีรสเปรี้ยวเนื่องจากมีกรด เป็นองค์ประกอบหลัก โดยกรดที่สามารถพบได้ เช่น กรดซิตริก กรดมาลิก และกรดแอสคอร์บิก (Da-Costa-Rocha *et al.*, 2014) เมื่อเวลาหมักเพิ่มขึ้นเชื้อแบคทีเรีย *A. pasteurianus* ยังผลิต กรดอินทรีย์ชนิดอื่นนอกจากกรดอะซิติก เช่น กรดกลูโคนิก กรดกลูคูโรนิก (Sievers *et al.*, 1995; Tran *et al.*, 2020; Nguyen *et al.*, 2015) โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน อีกทั้งยีสต์ *Z. bailii* YN403 มีการผลิตกรดอินทรีย์โดยใช้ซูโครสและกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเช่นกัน ทำให้ปริมาณกรด เพิ่มขึ้นและพีเอชมีค่าลดลงตลอดระยะเวลาการหมัก (Jayabalan *et al.*, 2014; Chen and Liu, 2000)

ตารางที่ 4.12 ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร) ของคอมบูชาจากชาดำ ชาดำผสม กระเจียบ และคอมบูชาจากกระเจียบ หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน

ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)				
อัตราส่วนชาดำ ผสมกระเจียบ	ระยะเวลาการหมัก (วัน)			
	0	3	7	10
C10R0	1.75±0.00 <sup>D,c</sup>	1.95±0.34 <sup>D,c</sup>	4.67±0.58 <sup>E,b</sup>	7.00±0.58 <sup>E,a</sup>
C8R2	3.31±0.34 <sup>C,d</sup>	5.45±0.67 <sup>C,c</sup>	11.29±0.34 <sup>D,b</sup>	12.26±0.58 <sup>D,a</sup>
C7R3	3.31±0.34 <sup>C,d</sup>	5.64±0.34 <sup>C,c</sup>	10.31±0.34 <sup>D,b</sup>	13.81±1.22 <sup>CD,a</sup>
C6R4	4.28±0.34 <sup>B,d</sup>	7.59±0.58 <sup>B,c</sup>	13.23±0.34 <sup>C,b</sup>	15.18±0.58 <sup>BC,a</sup>
C5R5	4.67±0.00 <sup>B,c</sup>	7.59±1.01 <sup>B,b</sup>	15.76±0.58 <sup>B,a</sup>	16.34±0.58 <sup>B,a</sup>
C0R10	10.12±0.89 <sup>A,c</sup>	14.79±0.67 <sup>A,b</sup>	18.68±1.54 <sup>A,a</sup>	20.24±1.47 <sup>A,a</sup>

- พิจารณาในแถวแนวตั้ง ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
- พิจารณาในแถวแนวนอน ตัวอักษรพิมพ์เล็กต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**รูปที่ 4.12** การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร) ระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชาจากชาดำ ชาดำผสมกระเจี๊ยบ และคอมบูชาจากกระเจี๊ยบ หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน

#### 4.5.1.2 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณแอลกอฮอล์

จากการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดแสดงดังตารางที่ 4.13 คอมบูชาจากชาดำ (C10R0) มีการลดลงของน้ำตาลน้อยกว่าเมื่อเทียบกับคอมบูชาชาดำผสมกระเจี๊ยบและคอมบูชากระเจี๊ยบที่มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญตลอดระยะเวลาการหมัก (รูปที่ 4.13) ซึ่งในวันสุดท้ายของการหมักคอมบูชาที่มีอัตราส่วนชาดำต่อกระเจี๊ยบ C10R0 C8R2 C7R3 C6R4 C5R5 และ C0R10 มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมด  $83.53 \pm 1.86$   $55.59 \pm 0.40$   $48.18 \pm 0.85$   $51.19 \pm 0.45$   $49.56 \pm 1.41$  และ  $48.66 \pm 0.93$  กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าคอมบูชาที่มีกระเจี๊ยบผสมรวมไปถึงคอมบูชากระเจี๊ยบ มีการใช้น้ำตาลมากกว่าคอมบูชาจากชาดำ สอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของปริมาณแอลกอฮอล์ (รูปที่ 4.14 และตารางที่ 4.14) โดยในวันสุดท้ายของการหมักคอมบูชาจากชาดำมีปริมาณแอลกอฮอล์น้อยที่สุด  $7.96 \pm 0.10$  กรัมต่อลิตร ในขณะที่อัตราส่วนชาดำผสมกระเจี๊ยบ C8R2 C7R3 C6R4 และ C5R5 มีปริมาณแอลกอฮอล์  $17.76 \pm 0.05$ ,  $18.14 \pm 0.04$ ,  $20.45 \pm 0.15$  และ  $20.91 \pm 0.09$  กรัมต่อลิตร คอมบูชากระเจี๊ยบมีปริมาณแอลกอฮอล์สูงที่สุด  $22.65 \pm 0.05$  กรัมต่อลิตร

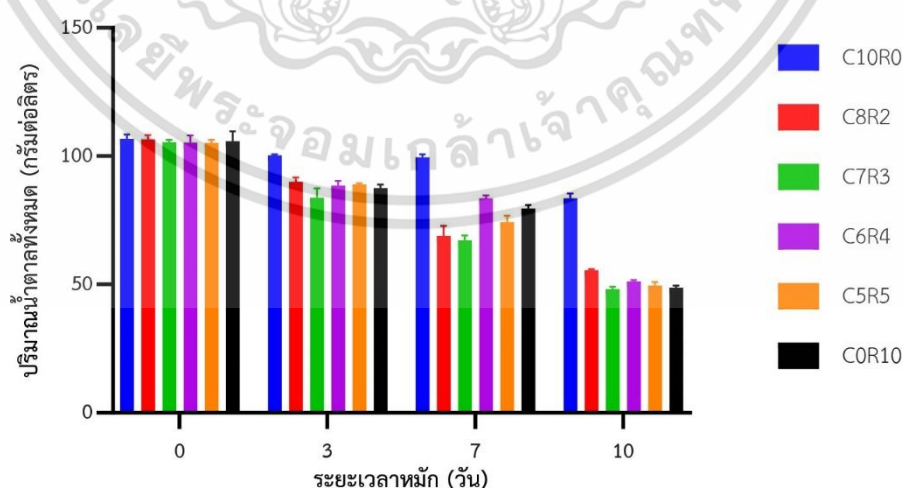
การลดลงของปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและการเพิ่มขึ้นของแอลกอฮอล์ในคอมบูชาจากชาดำผสมกระเจี๊ยบและคอมบูชากระเจี๊ยบ อาจเนื่องมาจากในอัตราส่วนดังกล่าวเชื้อยีสต์ *Z. bailii* YN403 สามารถใช้น้ำตาลได้ดีกว่าในคอมบูชาที่ใช้ชาดำเพียงอย่างเดียว โดยพบว่าปริมาณแอลกอฮอล์ของคอมบูชาจากชาดำผสมกระเจี๊ยบและคอมบูชากระเจี๊ยบสูงกว่าในคอมบูชาจากชาดำอย่างมีนัยสำคัญ การเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจนในคอมบูชาชาดำผสมกระเจี๊ยบ และคอมบูชากระเจี๊ยบเนื่องมาจากน้ำกระเจี๊ยบประกอบด้วย โปรตีน วิตามินซี เบต้าแคโรทีน ธาตุเหล็ก และกรดอินทรีย์ (กรดซิตริก กรดแอสคอร์บิก กรดมาลิก กรดฮิบไซลิก กรดออกซาลิก กรดทาร์ทาริก) (Dacosta-Rocha et al. 2014, Riaz and Chopra 2018) ซึ่งสารหลายชนิดมีส่วนช่วยในการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งโปรตีนสามารถเป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการเจริญเติบโตของเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อจุลินทรีย์ได้ จากงานวิจัยของ Chen *et al.* (2010) รายงานว่าเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สามารถเจริญและผลิตแอลกอฮอล์ได้ในน้ำกระเจียบแดงซึ่งพบปริมาณไนโตรเจน 176 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้เชื้อยีสต์ *Z. bailii* YN403 ที่ใช้ในการหมักคอมบูชาที่จัดเป็นเชื้อยีสต์ที่มีความสามารถในการทนกรด และมีความสามารถในการผลิตแอลกอฮอล์ได้สูง (ปิยวรรณ, 2562)

**ตารางที่ 4.13** ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร) ของคอมบูชาจากชาดำ ชาดำผสมกระเจียบ และคอมบูชาจากกระเจียบ หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน

อัตราส่วนชาดำ ผสมกระเจียบ	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)			
	ระยะเวลาการหมัก (วัน)			
	0	3	7	10
C10R0	106.64±1.84 <sup>A,a</sup>	100.34±0.34 <sup>A,b</sup>	99.59±1.09 <sup>A,b</sup>	83.53±1.86 <sup>A,c</sup>
C8R2	106.53±1.69 <sup>A,a</sup>	89.91±1.81 <sup>B,b</sup>	68.96±3.90 <sup>D,c</sup>	55.59±0.40 <sup>B,d</sup>
C7R3	105.37±0.97 <sup>A,a</sup>	83.85±3.55 <sup>C,b</sup>	67.13±1.92 <sup>D,c</sup>	48.18±0.85 <sup>C,d</sup>
C6R4	105.34±2.70 <sup>A,a</sup>	88.58±1.72 <sup>B,b</sup>	83.53±1.17 <sup>B,c</sup>	51.19±0.45 <sup>D,d</sup>
C5R5	105.21±1.05 <sup>A,a</sup>	88.96±0.46 <sup>B,b</sup>	74.37±2.48 <sup>C,c</sup>	49.56±1.41 <sup>CD,d</sup>
C0R10	105.77±3.87 <sup>A,a</sup>	87.60±1.31 <sup>B,b</sup>	79.60±1.40 <sup>B,c</sup>	48.66±0.93 <sup>D,d</sup>

- พิจารณาในแถวแนวนอน ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และ
- พิจารณาในแถวแนวตั้ง ตัวอักษรพิมพ์เล็กต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



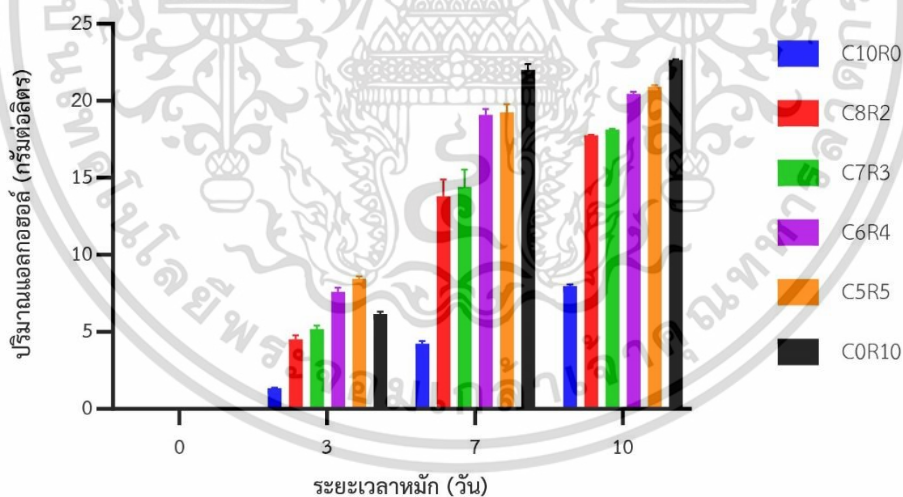
**รูปที่ 4.13** การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร) ระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชาจากชาดำ ชาดำผสมกระเจียบ และคอมบูชาจากกระเจียบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.14 ปริมาณแอลกอฮอล์ (กรัมต่อลิตร) ของคอมบูชาจากชาดำ ชาดำผสมกระเจี๊ยบ และคอมบูชาจากกระเจี๊ยบ หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน

ปริมาณแอลกอฮอล์ทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)				
อัตราส่วนชาดำ ผสมกระเจี๊ยบ	ระยะเวลาการหมัก (วัน)			
	0	3	7	10
C10R0	0.00±0.00 <sup>A,d</sup>	1.33±0.06 <sup>F,c</sup>	4.23±0.18 <sup>D,b</sup>	7.96±0.10 <sup>F,a</sup>
C8R2	0.00±0.00 <sup>A,d</sup>	4.52±0.26 <sup>E,c</sup>	13.81±1.07 <sup>C,b</sup>	17.76±0.05 <sup>E,a</sup>
C7R3	0.00±0.00 <sup>A,d</sup>	5.17±0.23 <sup>D,c</sup>	14.40±1.13 <sup>C,b</sup>	18.14±0.04 <sup>D,a</sup>
C6R4	0.00±0.00 <sup>A,d</sup>	7.58±0.29 <sup>B,c</sup>	19.09±0.38 <sup>B,b</sup>	20.45±0.15 <sup>C,a</sup>
C5R5	0.00±0.00 <sup>A,d</sup>	8.46±0.15 <sup>A,c</sup>	19.26±0.51 <sup>B,b</sup>	20.91±0.09 <sup>B,a</sup>
C0R10	0.00±0.00 <sup>A,d</sup>	6.15±0.16 <sup>C,c</sup>	22.00±0.38 <sup>A,b</sup>	22.65±0.05 <sup>A,a</sup>

พิจารณาในแนวตั้ง อักษรพิมพ์ใหญ่ต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และพิจารณาในแนวนอน อักษรพิมพ์เล็กต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



รูปที่ 4.14 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอลกอฮอล์ (กรัมต่อลิตร) ระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชาจากชาดำ ชาดำผสมกระเจี๊ยบ และคอมบูชาจากกระเจี๊ยบ

#### 4.5.2 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของคอมบูชาในระหว่างกระบวนการหมักชาดำผสมกระเจี๊ยบ

##### 4.5.2.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมด

ในวันเริ่มต้นการหมักปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่พบในคอมบูชาจากชาดำมีปริมาณสูงสุด  $516.76 \pm 3.58$  ไมโครกรัมสมมูลแกลลิกต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.15) และลดลงตามอัตราส่วนกระเจี๊ยบที่เพิ่มขึ้น (รูปที่ 4.15) อยู่ในช่วง  $236.57 - 497.32$  ไมโครกรัมสมมูลแกลลิกต่อมิลลิลิตร โดยคอมบูชาจากกระเจี๊ยบมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเฉลี่ยต่ำที่สุด  $236.57 \pm 7.93$  ไมโครกรัมสมมูลแกลลิกต่อมิลลิลิตร เมื่อเวลาหมักผ่านไปคอมบูชาจากชาดำ, ชาดำผสมกระเจี๊ยบ และคอมบูชากระเจี๊ยบมีการเพิ่มขึ้นของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุดในวันที่ 7 และลดลงในวันที่ 10 ในวันสุดท้ายของการหมักคอมบูชาจากชาดำและคอมบูชาชาดำผสมกระเจี๊ยบ อัตราส่วน C8R2 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูง ( $p < 0.05$ ) มีค่าเท่ากับ  $532.47 \pm 7.77$  และ  $525.63 \pm 6.14$  ไมโครกรัมสมมูลแกลลิกต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แตกต่างทางสถิติกับอัตราส่วนอื่น ( $p < 0.05$ )

ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดที่พบในคอมบูชาแต่ละอัตราส่วน (ตารางที่ 4.16) มีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงสอดคล้องกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด โดยคอมบูชาจากชาดำมีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงสุด และลดลงตามอัตราส่วนกระเจี๊ยบที่เพิ่มขึ้น (ตารางที่ 4.16) ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดจะเพิ่มขึ้นและมีปริมาณสูงสุดในวันที่ 7 โดยคอมบูชาอัตราส่วน C10R0 C8R2 C7R3 C6R4 C5R5 และ C0R10 มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด  $1216.48 \pm 4.10$ ,  $978.52 \pm 20.50$ ,  $811.02 \pm 8.04$ ,  $770.65 \pm 9.71$ ,  $582.41 \pm 14.91$  และ  $217.78 \pm 6.67$  ไมโครกรัมสมมูลเคอเวอซิทินต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในวันสุดท้ายของการหมักพบว่าคอมบูชาที่ใช้อัตราส่วนชาดำ 8 ส่วนผสมกระเจี๊ยบ 2 ส่วน (C8R2) มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงที่สุดในคอมบูชาที่มีการผสมชาสองชนิด แต่มีปริมาณน้อยกว่าคอมบูชาจากชาดำ

สารแอนโทไซยานินทั้งหมดแสดงดังรูปที่ 4.17 และตารางที่ 4.17 โดยในวันที่ 0 เมื่อเพิ่มอัตราส่วนกระเจี๊ยบในคอมบูชาพบว่าปริมาณสารแอนโทไซยานินมีค่าสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากกระเจี๊ยบแดงมีปริมาณสารแอนโทไซยานินสูง (Riaz and Chopra, 2018) และจากผลการทดลองไม่พบสารแอนโทไซยานินในคอมบูชาจากชาดำ เมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น ปริมาณสารแอนโทไซยานินมีค่าลดลงเรื่อยๆ เนื่องจากสารแอนโทไซยานินเป็นสารที่ไม่เสถียร และถูกทำลายได้โดยปัจจัยภายนอก เช่น กรดเบส อุณหภูมิสูง เอนไซม์ และแสง เป็นต้น (Riaz and Chopra, 2018; Wu *et al.*, 2018) ซึ่งในคอมบูชาที่มีภาวะความเป็นกรด และจุลินทรีย์มีการผลิตเอนไซม์ออกมาซึ่งส่งผลให้สารแอนโทไซยานินสลายตัวได้ง่าย สอดคล้องกับ Wu *et al.*, (2018)

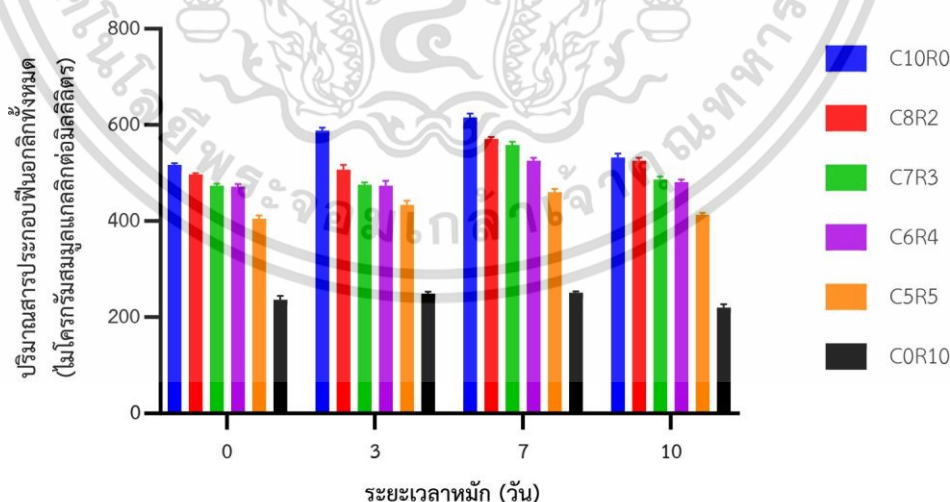
รายงานว่าการแอนโทไซยานินในสารสกัดกระเจี๊ยบแดงสามารถเสื่อมสลายในสถานะที่มีความเป็นกรด เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.15 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (ไมโครกรัมสมมูลแกลลิกต่อมิลลิลิตร) ของคอมบูชาจากชาดำ ชาดำผสมกระเจี๊ยบ และคอมบูชาจากกระเจี๊ยบ หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน

อัตราส่วนชาดำ ผสมกระเจี๊ยบ	ระยะเวลาการหมัก (วัน)			
	0	3	7	10
	C10R0	516.76 ± 3.58 <sup>A,d</sup>	558.63 ± 5.24 <sup>A,b</sup>	615.61 ± 7.84 <sup>A,a</sup>
C8R2	497.32 ± 2.01 <sup>B,c</sup>	507.32 ± 9.61 <sup>B,c</sup>	571.24 ± 3.59 <sup>B,a</sup>	525.63 ± 6.14 <sup>A,b</sup>
C7R3	473.84 ± 3.98 <sup>C,c</sup>	475.40 ± 5.13 <sup>C,c</sup>	558.33 ± 6.40 <sup>C,a</sup>	486.21 ± 5.94 <sup>B,b</sup>
C6R4	471.97 ± 5.20 <sup>C,b</sup>	473.96 ± 9.78 <sup>C,b</sup>	525.34 ± 6.16 <sup>D,a</sup>	480.85 ± 5.28 <sup>B,b</sup>
C5R5	404.76 ± 7.13 <sup>D,c</sup>	433.95 ± 8.70 <sup>D,b</sup>	460.54 ± 6.27 <sup>E,a</sup>	413.12 ± 4.07 <sup>C,c</sup>
C0R10	236.57 ± 7.93 <sup>E,b</sup>	249.05 ± 4.04 <sup>E,a</sup>	251.01 ± 2.54 <sup>F,a</sup>	220.53 ± 6.50 <sup>D,c</sup>

- พิจารณาในแถวแนวตั้ง ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
- พิจารณาในแถวแนวนอน ตัวอักษรพิมพ์เล็กต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



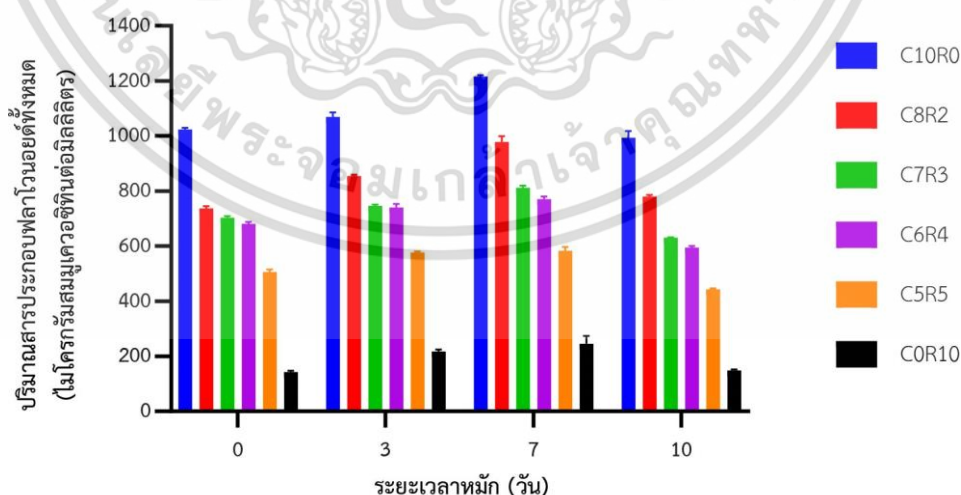
รูปที่ 4.15 การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (ไมโครกรัมสมมูลแกลลิกต่อมิลลิลิตร) ระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชาจากชาดำ ชาดำผสมกระเจี๊ยบ และคอมบูชาจากกระเจี๊ยบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.16 ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (ไมโครกรัมสมมูลเคอเวอซิทีนต่อมิลลิกรัม) ของคอมบูชาจากชาดำ ชาดำผสมกระเจี๊ยบ และคอมบูชาจากกระเจี๊ยบ หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน

อัตราส่วนชาดำ ผสมกระเจี๊ยบ	สารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (ไมโครกรัมสมมูลเคอเวอซิทีนต่อมิลลิกรัม)			
	ระยะเวลาการหมัก (วัน)			
	0	3	7	10
C10R0	1023.61 ± 5.88 <sup>A,c</sup>	1069.45 ± 16.02 <sup>A,b</sup>	1216.48 ± 4.10 <sup>A,a</sup>	993.93 ± 23.63 <sup>A,d</sup>
C8R2	736.67 ± 8.82 <sup>B,d</sup>	854.72 ± 4.44 <sup>B,b</sup>	978.52 ± 20.50 <sup>B,a</sup>	779.72 ± 5.46 <sup>B,c</sup>
C7R3	702.41 ± 6.44 <sup>C,c</sup>	746.11 ± 4.75 <sup>C,b</sup>	811.02 ± 8.04 <sup>C,a</sup>	630.93 ± 1.16 <sup>C,d</sup>
C6R4	680.19 ± 7.23 <sup>D,c</sup>	740.00 ± 12.62 <sup>C,b</sup>	770.65 ± 9.71 <sup>D,a</sup>	595.00 ± 4.81 <sup>D,d</sup>
C5R5	506.11 ± 8.39 <sup>E,c</sup>	576.48 ± 3.78 <sup>D,b</sup>	582.41 ± 14.91 <sup>E,a</sup>	443.33 ± 3.33 <sup>E,d</sup>
C0R10	142.41 ± 5.48 <sup>F,c</sup>	245.93 ± 27.90 <sup>E,b</sup>	217.78 ± 6.67 <sup>F,a</sup>	148.89 ± 3.33 <sup>F,c</sup>

- พิจารณาในแถวแนวนอน ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
- พิจารณาในแถวแนวนอน ตัวอักษรพิมพ์เล็กต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



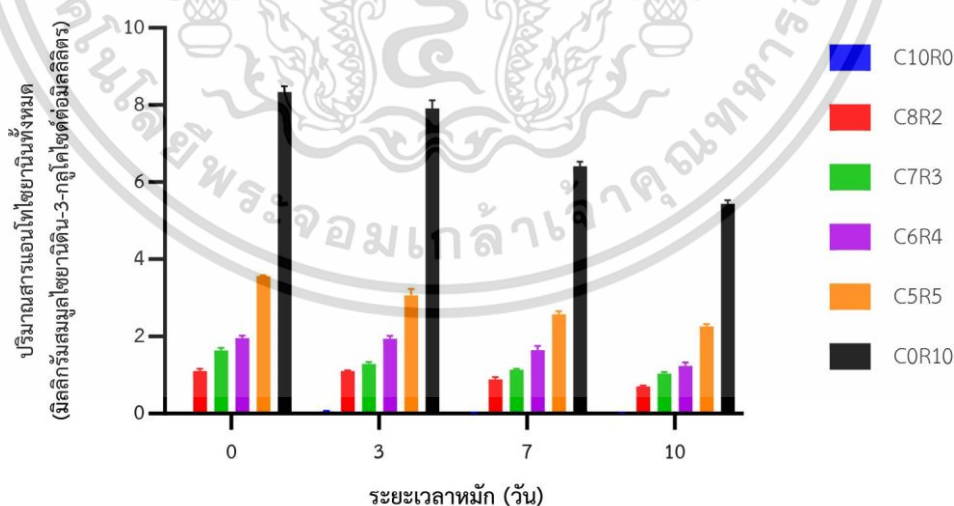
รูปที่ 4.16 การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (ไมโครกรัมสมมูลเคอเวอซิทีนต่อมิลลิกรัม) ระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชาจากชาดำ ชาดำผสมกระเจี๊ยบ และคอมบูชาจากกระเจี๊ยบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.17 ปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมด (มิลลิกรัมสมมูลไอซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ต่อมิลลิลิตร) ของคอมบูชาจากชาดำ ชาดำผสมกระเจี๊ยบ และคอมบูชาจากกระเจี๊ยบ หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน

สารแอนโทไซยานินทั้งหมด (มิลลิกรัมสมมูลไอซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ต่อมิลลิลิตร)				
อัตราส่วนชาดำ ผสมกระเจี๊ยบ	ระยะเวลาการหมัก (วัน)			
	0	3	7	10
C10R0	0.00 ± 0.00 <sup>F,b</sup>	0.06 ± 0.02 <sup>E,a</sup>	0.01 ± 0.01 <sup>F,b</sup>	0.00 ± 0.01 <sup>F,b</sup>
C8R2	1.10 ± 0.06 <sup>E,a</sup>	1.11 ± 0.02 <sup>D,a</sup>	0.89 ± 0.06 <sup>E,b</sup>	0.70 ± 0.03 <sup>E,c</sup>
C7R3	1.49 ± 0.09 <sup>D,a</sup>	1.29 ± 0.05 <sup>D,b</sup>	1.12 ± 0.03 <sup>D,c</sup>	1.04 ± 0.04 <sup>D,c</sup>
C6R4	2.06 ± 0.07 <sup>C,a</sup>	1.93 ± 0.08 <sup>C,a</sup>	1.64 ± 0.11 <sup>C,b</sup>	1.24 ± 0.09 <sup>C,c</sup>
C5R5	3.56 ± 0.03 <sup>B,a</sup>	3.06 ± 0.16 <sup>B,b</sup>	2.57 ± 0.09 <sup>B,c</sup>	2.26 ± 0.06 <sup>B,d</sup>
C0R10	8.33 ± 0.15 <sup>A,a</sup>	7.91 ± 0.21 <sup>A,b</sup>	6.41 ± 0.12 <sup>A,c</sup>	5.44 ± 0.09 <sup>A,d</sup>

- พิจารณาในแถวแนวนอน ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
- พิจารณาในแถวแนวนอน ตัวอักษรพิมพ์เล็กต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



รูปที่ 4.17 การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมด (มิลลิกรัมสมมูลไอซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ต่อมิลลิลิตร) ระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชาจากชาดำ ชาดำผสมกระเจี๊ยบ และคอมบูชาจากกระเจี๊ยบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.5.2.2 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS

ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS แสดงดังตารางที่ 4.18 โดยรายงานค่าความเข้มข้นของคอมบูชาที่สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (IC<sub>50</sub>) จากผลการทดลองพบว่าวันเริ่มต้นของการหมักค่า IC<sub>50</sub> ของ DPPH ในคอมบูชาจากชาดำผสมกระเจี๊ยบ อัตราส่วน C8R2, C7R3 และ C6R4 มีค่า IC<sub>50</sub> สูงที่สุดเท่ากับ  $1.87 \pm 0.08$ ,  $1.88 \pm 0.04$  และ  $1.91 \pm 0.07$  มิลลิกรัมสมมูลกรดแอสคอร์บิกต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และเมื่อเวลาหมักเพิ่มขึ้นพบว่าค่า IC<sub>50</sub> ในคอมบูชาทุกอัตราส่วนมีค่าสูงขึ้น (รูปที่ 4.18) โดยวันสุดท้ายของการหมักคอมบูชาผสมกระเจี๊ยบในอัตราส่วน C8R2 มีค่า IC<sub>50</sub> สูงสุดเท่ากับ  $3.06 \pm 0.07$  มิลลิกรัมสมมูลกรดแอสคอร์บิกต่อมิลลิลิตร สอดคล้องกับค่า IC<sub>50</sub> ของอนุมูลอิสระ ABTS พบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาในการหมักเพิ่มขึ้น แสดงดังรูปที่ 4.19 แสดงให้เห็นความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมัก โดยในวันสุดท้ายของการหมักค่า IC<sub>50</sub> ของ ABTS สูงที่สุดในคอมบูชาชาดำผสมกระเจี๊ยบอัตราส่วน C8R2 เท่ากับ  $3.44 \pm 0.22$  มิลลิกรัมสมมูลโทรลอกซ์ต่อมิลลิลิตร รองลงมาเป็นคอมบูชาจากชาดำมีค่า IC<sub>50</sub> เทียบกับสารมาตรฐานเท่ากับ  $2.37 \pm 0.03$  มิลลิกรัมสมมูลโทรลอกซ์ต่อมิลลิลิตร(ตารางที่ 4.19)

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมาจากชาดำเป็นหลัก ซึ่งคอมบูชาจากกระเจี๊ยบ (C0R10) มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่าคอมบูชาจากชาดำ (C10R0) อาจเนื่องมาจากในชาดำประกอบด้วยสารออกฤทธิ์ชีวภาพหลายชนิด เช่น สารฟลาโวนอยด์, สารฟีนอลิก และกลุ่มสารประกอบโพลีฟีนอลิก 6 กลุ่ม (Naveed *et al.*, 2018) ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณสารประกอบชีวภาพ (ตารางที่ 4.15) โดยค่าเหล่านี้ส่งผลต่อค่า IC<sub>50</sub> ของคอมบูชา

คอมบูชาที่ใช้ชาดำผสมกระเจี๊ยบอัตราส่วน C8R2 พบว่ามีค่า IC<sub>50</sub> สูงกว่าในคอมบูชาจากชาดำ อาจเนื่องมาจากนอกเหนือจากสารแอนโทไซยานินแล้ว สารที่พบได้ในกระเจี๊ยบแดง เช่น กรดแอสคอร์บิก (C) โรโบฟลาวิน (B2) ไนอะซิน (B3) (Riaz and Chopra, 2018) ล้วนเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เมื่อใช้กระเจี๊ยบแดงร่วมกับชาดำในอัตราส่วนชาดำต่อกระเจี๊ยบ C8R2, C7R3 และ C6R4 ทำให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ในวันเริ่มต้นการหมักสูงกว่าจนถึงใกล้เคียงกับการใช้ชาดำเพียงอย่างเดียวในการผลิตคอมบูชาที่หมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์ สอดคล้องกับการศึกษาของ Sun *et al.*, (2015) ที่ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของชาดำผสมต้นอ่อนข้าวสาลีในอัตราส่วนต่างๆ พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณต้นอ่อนข้าวสาลีและลดปริมาณชาดำลง ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH, ABTS และ ORAC สูงขึ้น สอดคล้องกับปริมาณสารประกอบทางชีวภาพที่สูงขึ้น จากผลวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นที่ใช้ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ดังนั้นจึงทำการเลือกอัตราส่วนชาดำผสมกระเจี๊ยบ 8 ต่อ 2 C8R2 (ชาดำร้อยละ 0.8 และกระเจี๊ยบร้อยละ 0.2 โดยปริมาตร) ที่หมักด้วยเชื้อผสม B8Y2

(*A. pasteurianus* AJ605 และ *Z. bailii* YN403 อัตราส่วน 8 ต่อ 2 ส่วน) ศึกษาในหัวข้อต่อไป

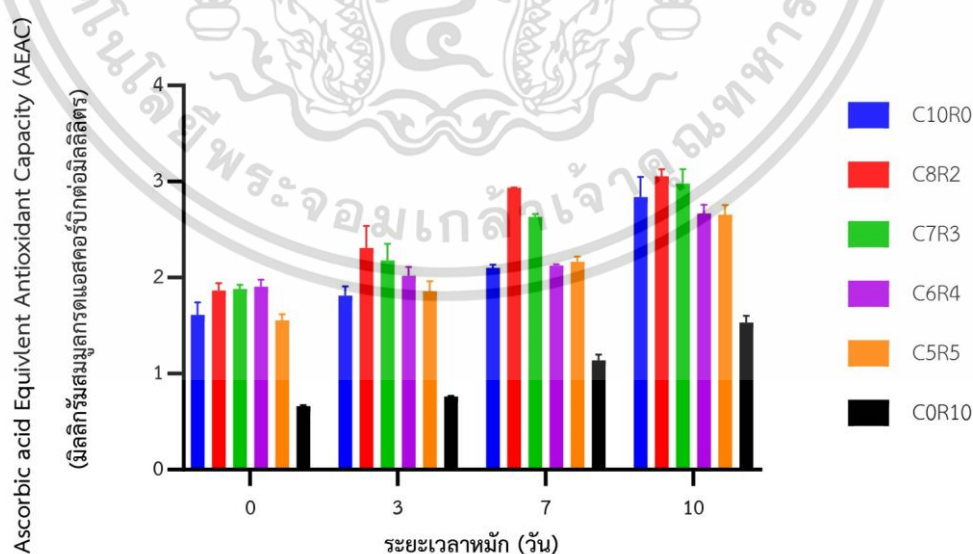
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.18 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (มิลลิกรัมสมมูลแอสคอร์บิกต่อมิลลิลิตร) ของคอมบูชาจากชาดำ ชาดำผสมกระเจี๊ยบ และคอมบูชาจากกระเจี๊ยบ หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน

อัตราส่วนชาดำ ผสมกระเจี๊ยบ	ระยะเวลาการหมัก (วัน)			
	0	3	7	10
C10R0	1.61 ± 0.13 <sup>B,c</sup>	1.81 ± 0.10 <sup>C,c</sup>	2.11 ± 0.04 <sup>C,b</sup>	2.84 ± 0.21 <sup>AB,a</sup>
C8R2	1.87 ± 0.08 <sup>A,c</sup>	2.31 ± 0.23 <sup>A,c</sup>	2.93 ± 0.01 <sup>A,a</sup>	3.06 ± 0.07 <sup>A,a</sup>
C7R3	1.88 ± 0.04 <sup>A,d</sup>	2.18 ± 0.18 <sup>AB,c</sup>	2.63 ± 0.03 <sup>B,b</sup>	2.98 ± 0.15 <sup>A,a</sup>
C6R4	1.91 ± 0.07 <sup>A,c</sup>	2.02 ± 0.10 <sup>BC,bc</sup>	2.12 ± 0.02 <sup>C,b</sup>	2.67 ± 0.09 <sup>B,a</sup>
C5R5	1.56 ± 0.06 <sup>B,d</sup>	1.86 ± 0.11 <sup>C,c</sup>	2.17 ± 0.05 <sup>C,b</sup>	2.65 ± 0.10 <sup>B,a</sup>
C0R10	0.66 ± 0.01 <sup>C,d</sup>	0.76 ± 0.01 <sup>D,c</sup>	1.14 ± 0.06 <sup>D,b</sup>	1.53 ± 0.07 <sup>C,a</sup>

- พิจารณาในแถวแนวนอน ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
- พิจารณาในแถวแนวตั้ง ตัวอักษรพิมพ์เล็กต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



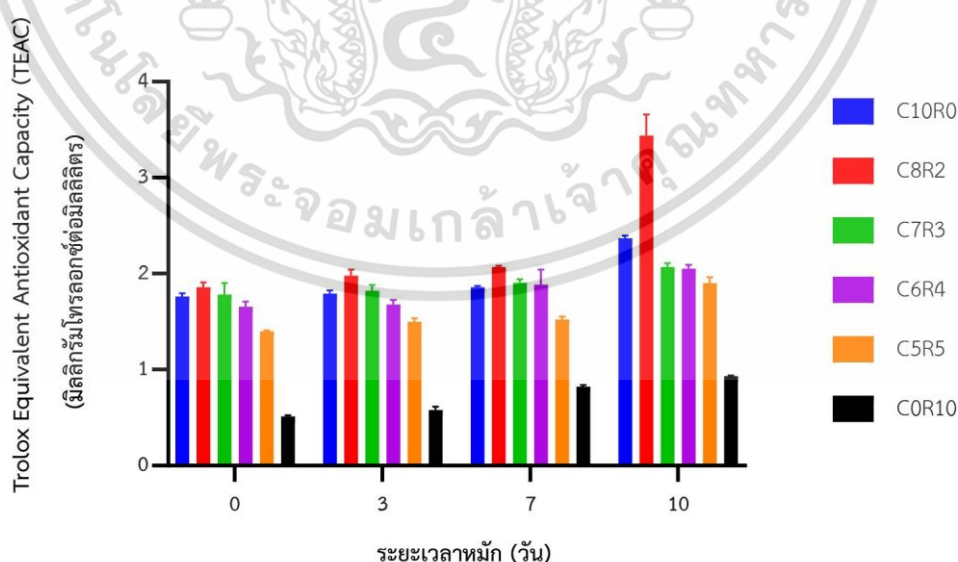
รูปที่ 4.18 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของคอมบูชาที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ร้อยละ 50 (IC<sub>50</sub>) (มิลลิกรัมสมมูลกรดแอสคอร์บิกต่อมิลลิลิตร) ระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชาจากชาดำ ชาดำผสมกระเจี๊ยบ และคอมบูชาจากกระเจี๊ยบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.19 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS (มิลลิกรัมสมมูลโทรลอคซ์ต่อมิลลิลิตร) ของคอมบูชาจากชาดำ ชาดำผสมกระเจี๊ยบ และคอมบูชาจากกระเจี๊ยบ หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน

ความเข้มข้นของคอมบูชาที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ร้อยละ 50 (IC <sub>50</sub> ) (มิลลิกรัมโทรลอคซ์ต่อมิลลิลิตร)				
อัตราส่วนชาดำ ผสมกระเจี๊ยบ	ระยะเวลาการหมัก (วัน)			
	0	3	7	10
C10R0	1.76 ± 0.03 <sup>AB,c</sup>	1.79 ± 0.03 <sup>B,c</sup>	1.86 ± 0.02 <sup>B,b</sup>	2.37 ± 0.03 <sup>B,a</sup>
C8R2	1.86 ± 0.05 <sup>A,b</sup>	1.98 ± 0.06 <sup>A,b</sup>	2.07 ± 0.01 <sup>A,b</sup>	3.44 ± 0.22 <sup>A,a</sup>
C7R3	1.78 ± 0.12 <sup>A,b</sup>	1.82 ± 0.06 <sup>B,b</sup>	1.91 ± 0.04 <sup>B,b</sup>	2.07 ± 0.04 <sup>C,a</sup>
C6R4	1.65 ± 0.05 <sup>B,c</sup>	1.68 ± 0.05 <sup>C,c</sup>	1.88 ± 0.16 <sup>B,b</sup>	2.05 ± 0.04 <sup>C,a</sup>
C5R5	1.40 ± 0.01 <sup>C,c</sup>	1.50 ± 0.03 <sup>D,b</sup>	1.52 ± 0.03 <sup>C,b</sup>	1.90 ± 0.06 <sup>C,a</sup>
C0R10	0.51 ± 0.01 <sup>D,d</sup>	0.58 ± 0.04 <sup>E,c</sup>	0.82 ± 0.02 <sup>D,b</sup>	0.93 ± 0.01 <sup>D,a</sup>

- พิจารณาในแถวแนวตั้ง ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
- พิจารณาในแถวแนวนอน ตัวอักษรพิมพ์เล็กต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



รูปที่ 4.19 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของคอมบูชาที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ร้อยละ 50 (IC<sub>50</sub>) (มิลลิกรัมสมมูลโทรลอคซ์ต่อมิลลิลิตร) ระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชาจากชาดำ ชาดำผสมกระเจี๊ยบ และคอมบูชาจากกระเจี๊ยบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.6 ผลของปริมาณมอลโตเดกซ์ทรินในการทำผงแห้งของคอมบูชาด้วยวิธีทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dried)

เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนารูปแบบเครื่องดื่มคอมบูชาให้มีความแตกต่างจากรูปแบบเดิม จึงได้พัฒนาเป็นเครื่องดื่มรูปแบบผงชงดื่ม โดยเติมมอลโตเดกซ์ทรินในปริมาณร้อยละ 10, 15 และ 20 โดยน้ำหนัก และนำไปแช่เยือกแข็ง ผลการวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ เคมี และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของเครื่องดื่มก่อนและหลังทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งพบว่า

##### 4.6.1 คุณภาพทางเคมีและกายภาพของคอมบูชาก่อนและหลังกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง รวมทั้งปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังกระบวนการทำแห้ง

นำคอมบูชาผง (หลังกระบวนการทำแห้ง) มาทำการละลายน้ำ ตรวจสอบคุณภาพทางเคมีเปรียบเทียบกับเครื่องดื่มคอมบูชาก่อนทำแห้ง ผลการวิเคราะห์แสดงดังตารางที่ 4.20 จากการเพิ่มปริมาณมอลโตเดกซ์ทรินในคอมบูชาก่อนนำไปทำแห้งพบว่า ค่าพีเอชไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญและไม่ส่งผลต่อปริมาณกรดทั้งหมดในเครื่องดื่มคอมบูชา สอดคล้องกับงานวิจัยของ Caliskan *et al.*, (2015) ศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของผงน้ำกีวีเข้มข้นที่ทำแห้งด้วยวิธีการแช่เยือกแข็งและผสมสารมอลโตเดกซ์ทรินร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก พบว่าค่าพีเอชของน้ำกีวีเข้มข้นที่เติมสารมอลโตเดกซ์ทรินไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) กับตัวอย่างที่ไม่เติม และค่าพีเอชของผงน้ำกีวีที่ผสมมอลโตเดกซ์ทรินมีค่าสูงกว่าตัวอย่างผงไม่เติมสารมอลโตเดกซ์ทริน

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในเครื่องดื่มคอมบูชาก่อนทำแห้งพบว่ามีความเพิ่มขึ้นตามปริมาณมอลโตเดกซ์ทรินที่ผสมลงไปโดยคอมบูชาที่ผสมมอลโตเดกซ์ทรินร้อยละ 10 15 และ 20 มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ  $167.16 \pm 0.74$ ,  $228.19 \pm 1.03$  และ  $276.89 \pm 0.90$  กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากการผสมมอลโตเดกซ์ทรินลงในเครื่องดื่มคอมบูชาเป็นการเพิ่มปริมาณร้อยละของแข็งในเครื่องดื่ม ส่งผลให้ปริมาณร้อยละของของเหลวลดลง เมื่อวิเคราะห์ค่าความชื้นพบว่าความชื้นลดลงตามปริมาณมอลโตเดกซ์ทรินที่เติมลงไป

เมื่อคอมบูชาผ่านทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dried) พบว่าคอมบูชาที่ผสมมอลโตเดกซ์ทรินร้อยละ 10 15 และ 20 มีปริมาณกรดทั้งหมด  $11.7 \pm 0.60$ ,  $9.97 \pm 0.55$ ,  $9.76 \pm 0.85$  กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับก่อนทำแห้ง สอดคล้องกับค่าพีเอชที่เพิ่มขึ้น การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งใช้หลักการระเหิดน้ำในสถานะของแข็งออกจากผลิตภัณฑ์ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลักษณะร่วน (Nowak and Jakubczyk, 2020) ซึ่งนอกจากน้ำแข็งแล้วสารระเหยและกรดอินทรีย์บางส่วนก็ระเหยออกไปเช่นกัน (Caliskan *et al.*, 2015) ทำให้ปริมาณกรดที่วัดได้มีค่าลดลง สอดคล้องกับการศึกษาของ Zhang *et al.*, (2020) ศึกษาปริมาณสารระเหยคงเหลือในน้ำลูกยอหมัก ทำแห้งด้วยวิธีแช่เยือกแข็ง (Freeze dried) พบว่าปริมาณสารระเหย เช่น กรดอะซิติก กรดบิวทานอิก หลังผ่านกระบวนการทำแห้งมีปริมาณลดลง

ตารางที่ 4.20 ลักษณะทางเคมีของคอมบูชาจากชาดำผสมกระเจี๊ยบอัตราส่วน 8 ต่อ 2 หมักด้วยเชื้อ *A. pasteurianus* AJ605 และ *Z. bailii* YN403 อัตราส่วน 8 ต่อ 2 เป็นเวลา 10 วัน ก่อนและหลัง ทำแห้งด้วยวิธีทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dried)

	มอลโตเดกซ์ทริน (ร้อยละ)	ก่อนทำแห้ง	หลังทำแห้ง
พีเอช	10	2.46±0.02 <sup>a,1</sup>	2.60±0.01 <sup>C,2</sup>
	15	2.51±0.02 <sup>a,1</sup>	2.72±0.01 <sup>B,2</sup>
	20	2.53±0.02 <sup>a,1</sup>	2.74±0.01 <sup>A,2</sup>
ปริมาณกรดทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	10	17.96±0.33 <sup>a,1</sup>	11.7±0.60 <sup>A,2</sup>
	15	17.17±0.90 <sup>a,1</sup>	9.97±0.55 <sup>B,2</sup>
	20	16.98±0.59 <sup>a,1</sup>	9.76±0.85 <sup>B,2</sup>
น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	10	167.16±0.74 <sup>c,1</sup>	165.48±0.88 <sup>C,2</sup>
	15	228.19±1.03 <sup>b,1</sup>	225.18±1.10 <sup>B,2</sup>
	20	276.89±0.90 <sup>a,2</sup>	269.73±3.58 <sup>A,2</sup>
ความชื้น (ร้อยละ)	10	86.76±0.03 <sup>a</sup>	4.72±0.17 <sup>A</sup>
	15	81.91±0.01 <sup>b</sup>	4.70±0.48 <sup>A</sup>
	20	78.50±0.02 <sup>c</sup>	3.49±0.04 <sup>B</sup>
ปริมาณน้ำอิสระ	10	0.987±0.02 <sup>a</sup>	0.256±0.005 <sup>A</sup>
	15	0.985±0.02 <sup>a</sup>	0.255±0.009 <sup>A</sup>
	20	0.980±0.00 <sup>b</sup>	0.251±0.003 <sup>A</sup>

- พิจารณาในแถวแนวตั้ง ตัวอักษรพิมพ์เล็ก แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละปัจจัย ก่อนทำแห้ง และตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละปัจจัยหลัง ทำแห้งที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
- พิจารณาในแถวแนวนอน ตัวเลขที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ระหว่างตัวอย่างคอมบูชาก่อนทำแห้งและหลังทำแห้ง

ค่าความชื้นของเครื่องดื่มคอมบูชาพบว่าปริมาณความชื้นลดลงเมื่อปริมาณมอลโต-เดกซ์ทรินเพิ่มขึ้น โดยการเติมมอลโตเดกซ์ทรินร้อยละ 10 15 และ 20 คอมบูชามีความชื้นร้อยละ 86.76±0.03, 81.91±0.01 และ 78.50±0.02 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่ามอลโตเดกซ์ทรินเข้าไปเพิ่ม ปริมาณของแข็งในเครื่องดื่มทำให้ความชื้นลดลง (Caliskan and Dirim, 2015) และหลังกระบวนการ แช่เยือกแข็ง ผงคอมบูชามีความชื้นอยู่ที่ร้อยละ 4.72±0.17, 4.70±0.48 และ 3.49±0.04 ตามลำดับ และมีปริมาณน้ำอิสระเท่ากับ 0.256±0.005, 0.255±0.009 และ 0.251±0.003 ตามลำดับ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และสอดคล้องกับปริมาณความชื้น ผลการวิเคราะห์สอดคล้องกับงานวิจัยของ Michalska-Ciechanowska *et al.*, (2020) ทำการเติมมอลโตเดกซ์ทรินลงในน้ำแครนเบอร์รี่ร้อยละ 15, 25 และ 35 พบว่าความชื้นผงอยู่ที่ 7.78, 7.23 และ 6.28 และมีค่าปริมาณน้ำอิสระเท่ากับ 0.30, 0.40 และ 0.36 ตามลำดับ

**ตารางที่ 4.21** ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total plate count) และเชื้อ *Escherichia coli* และ Coliform ในตัวอย่างผงคอมบูชาที่ผสมมอลโตเดกซ์ทรินปริมาณที่แตกต่างกัน

ปริมาณ มอลโตเดกซ์ทริน (ร้อยละ)	Total plate count (CFU/mL)	<i>Escherichia coli</i> (CFU/mL)	Coliform (CFU/mL)
10	<100	<10	<10
15	<100	<10	<10
20	<100	<10	<10

จากการวิเคราะห์พบว่าปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total plate count) ในตัวอย่างผงคอมบูชาหลังทำแห้งมีค่า <100 CFU/mL และจากการทดสอบปริมาณเชื้อก่อโรค *Escherichia coli* และ Coliform แสดงดังตารางที่ 4.21 ไม่พบการเจริญของจุลินทรีย์ทุกระดับความเจือจาง

จำนวนโคโลนีจะถูกรายงานเป็นค่าน้อยกว่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจได้ ซึ่งมีปริมาณน้อยกว่า 10 CFU/mL แสดงให้เห็นว่าการเติมสารโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ความเข้มข้น 200 ppm ในเครื่องต้มคอมบูชาผสมมอลโตเดกซ์ทรินความเข้มข้นต่างๆ สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในเครื่องต้มคอมบูชา ให้เป็นไปตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนของกระเจี๊ยบแดงผงสำเร็จรูป (มผช. 168/2556)

#### 4.6.2 ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของคอมบูชาก่อนและหลังกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

คอมบูชาก่อนทำแห้งมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดลดลงเมื่อเพิ่มปริมาณมอลโตเดกซ์ทริน แสดงดังตารางที่ 4.22 การเติมมอลโตเดกซ์ทรินร้อยละ 10 15 และ 20 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีผลให้คอมบูชามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด  $566.98 \pm 3.00$ ,  $550.15 \pm 7.15$  และ  $516.29 \pm 7.93$  ไมโครกรัมสมมูลแกลลิกต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ภายหลังจากการทำแห้งพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมีค่า  $409.78 \pm 11.27$ ,  $430.83 \pm 17.04$  และ  $413.98 \pm 8.51$  ไมโครกรัมสมมูลแกลลิกต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งลดลงจากก่อนการทำแห้งอย่างมีนัยสำคัญ

( $p < 0.05$ ) เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เช่นเดียวกับการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมด พบว่าหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง การเติมมอลโตเดกซ์ทรินร้อยละ 10 15 และ 20 มีปริมาณสารแอนโทไซยานินลดลงโดยมีค่า  $0.41 \pm 0.03$ ,  $0.39 \pm 0.03$  และ  $0.26 \pm 0.01$  มิลลิกรัมสมมูลไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Romero-Gonzalez *et al.* (2020) รายงานว่าตัวอย่างผงแห้งสารสกัดผลมากิเบอร์รี่ทำแห้งด้วยวิธีการแช่เยือกแข็ง และผสมสารมอลโตเดกซ์ทรินมีปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมดต่ำกว่าก่อนทำแห้งประมาณร้อยละ 50 และมีค่าลดลงอีกเมื่อเพิ่มปริมาณมอลโตเดกซ์ทรินที่ผสมลงไป จากตารางที่ 4.22 แสดงให้เห็นว่าคอมบูชาที่มีการผสมมอลโตเดกซ์ทรินร้อยละ 15 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกคงเหลือสูงสุด และมีสารแอนโทไซยานินคงเหลือสูงกว่าอัตราส่วนผสมมอลโตเดกซ์ทรินร้อยละ 10 และร้อยละ 20 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Michalska-Ciechanowska *et al.*, (2020) วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของผงน้ำแครนเบอร์รี่ พบว่าที่ความเข้มข้นมอลโตเดกซ์ทรินร้อยละ 25 และ 35 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดต่ำกว่าตัวอย่างที่ผสมมอลโตเดกซ์ทรินร้อยละ 15

การลดลงของสารประกอบชีวภาพหลังผ่านกระบวนการทำแห้งเนื่องมาจากการที่สัมผัสกับออกซิเจน รวมทั้งการเกิดรูพรุนของผนังสารห่อหุ้มที่เกิดจากการระเหิดของน้ำหลังการทำแห้ง ทำให้ลดการปกป้องสารประกอบชีวภาพจากปัจจัยภายนอก เช่น ออกซิเจน แสง หรืออุณหภูมิ ส่งผลให้เกิดการสลายของสารประกอบชีวภาพที่ถูกหุ้มไว้ (Tkacz *et al.*, 2020) ดังนั้นการประเมินความสามารถในการรักษาสารประกอบชีวภาพภายหลังการทำแห้งจึงนำมาใช้เป็นปัจจัยหนึ่งในการคัดเลือกปริมาณสารมอลโตเดกซ์ทรินที่เหมาะสมที่ใช้ในการทำแห้งของคอมบูชา

จากการคำนวณค่าความสามารถในการรักษาสารประกอบชีวภาพ พบว่าค่าความสามารถในการรักษาสารประกอบทั้งสองชนิดมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณมอลโตเดกซ์ทริน สอดคล้องกับงานวิจัยของ Estupinan-Amaya *et al.*, (2020) ศึกษาการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง น้ำบลูเบอร์รี่ด้วยการผสมมอลโตเดกซ์ทรินร้อยละ 20 – 50 โดยน้ำหนัก พบว่าความสามารถในการรักษาสารประกอบฟีนอลิกเพิ่มขึ้นตามปริมาณมอลโตเดกซ์ทรินที่ผสมลงไป และการผสมมอลโตเดกซ์ทรินร้อยละ 30 โดยน้ำหนักมีค่าความสามารถในการรักษาสารแอนโทไซยานินทั้งหมดได้ดีที่สุดคิดเป็นร้อยละ 75 จากการทดลองในงานวิจัยนี้ พบว่าสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในตัวอย่างคอมบูชาที่เติมมอลโตเดกซ์ทรินร้อยละ 10 และ 15 มีค่าความสามารถในการรักษาสารประกอบชีวภาพอยู่ที่ร้อยละ 78.33 – 79.37 ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) ในขณะที่ค่าความสามารถในการรักษาสารแอนโทไซยานินไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในทุกตัวอย่างมีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 59.21 – 63.66 แสดงดังตารางที่ 4.22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (IC<sub>50</sub>) ของเครื่องดื่มคอมบูชาที่ผสมมอลโตเดกซ์ทรินร้อยละ 10 15 และ 20 พบว่าค่า IC<sub>50</sub> ลดลงตามปริมาณมอลโตเดกซ์ทรินที่ผสมลงไป (ตารางที่ 4.22) โดยค่า IC<sub>50</sub> เทียบกับสารมาตรฐานมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) และเมื่อนำไปทำแท่งพบว่าค่า IC<sub>50</sub> เทียบกับสารมาตรฐานมีค่าลดลง โดยเครื่องดื่มคอมบูชาที่ผสมมอลโตเดกซ์ทรินร้อยละ 10 15 และ 20 มีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ  $1.86 \pm 0.03$ ,  $1.87 \pm 0.04$  และ  $1.65 \pm 0.06$  ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าหลังการทำแท่งเครื่องดื่มคอมบูชาที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระลดลง สัมพันธ์กับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และสารแอนโทไซยานินทั้งหมดที่ลดลงไปหลังกระบวนการทำแท่ง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Estupinan-Amaya *et al.*, (2020) รายงานการลดลงของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารแอนโทไซยานินทั้งหมด และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ในผงน้ำแอนเดียนเบอร์รี่ที่ได้จากกระบวนการทำแท่งแบบแช่เยือกแข็ง โดยมีค่าลดลงเมื่อเพิ่มปริมาณมอลโตเดกซ์ทรินมากขึ้น เช่นเดียวกับปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมด และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของผงน้ำหมากเมาที่มีแนวโน้มลดลงเมื่อเพิ่มปริมาณมอลโตเดกซ์ทริน (Suravanichnirachorn *et al.*, 2018) ทั้งนี้จากตาราง 4.22 แสดงให้เห็นว่าคอมบูชาผสมมอลโตเดกซ์ทรินร้อยละ 10 และ 15 มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าคอมบูชาผสมมอลโตเดกซ์ทรินปริมาณร้อยละ 20 อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ )

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณของสารประกอบชีวภาพในคอมบูชาหลังผ่านการทำแท่งเมื่อพิจารณาค่าความสามารถในการรักษาสารประกอบชีวภาพ รวมไปถึงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH จึงทำการคัดเลือกเครื่องดื่มคอมบูชาที่มีการเติมมอลโตเดกซ์ทรินร้อยละ 15 ทดสอบทางประสาทสัมผัสต่อไป

ตารางที่ 4.22 ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของคอมบูชาจากชาดำผสมกระเจี๊ยบผสมกับสารมอลโตเดกซ์ทรีนก่อนและหลังการทำผงแห้ง

ปริมาณมอลโตเดกซ์ทรีน (ร้อยละ)	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (ไมโครกรัมสมมูลแกลลิกต่อมิลลิลิตร)		ปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมด (มิลลิกรัมสมมูลไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ต่อมิลลิลิตร)		ความเข้มข้นของคอมบูชาที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH 50% (IC <sub>50</sub> ) เทียบกับสารมาตรฐาน (มิลลิกรัมสมมูลกรดแอสตอร์บิกต่อมิลลิลิตร)	
	ความสามารถในการรักษาสารประกอบชีวภาพ (ร้อยละ)	ความสามารถในการรักษาสารประกอบชีวภาพ (ร้อยละ)	ความสามารถในการรักษาสารประกอบชีวภาพ (ร้อยละ)	ความสามารถในการรักษาสารประกอบชีวภาพ (ร้อยละ)		
คอมบูชาก่อนทำแห้ง	10	566.98±3.00 <sup>a,1</sup>	100	0.69±0.02 <sup>a,1</sup>	100	2.51±0.03 <sup>a,1</sup>
	15	550.15±7.15 <sup>b,1</sup>	100	0.64±0.03 <sup>a,1</sup>	100	2.39±0.04 <sup>ab,1</sup>
	20	516.29±7.93 <sup>c,2</sup>	100	0.42±0.05 <sup>b,1</sup>	100	2.31±0.12 <sup>b,1</sup>
คอมบูชาหลังทำแห้ง	10	409.78±11.27 <sup>A,2</sup>	73.02±1.75 <sup>B</sup>	0.41±0.03 <sup>A,2</sup>	59.21±3.52 <sup>A</sup>	1.86±0.03 <sup>A,2</sup>
	15	430.83±17.04 <sup>A,2</sup>	78.33±1.68 <sup>A</sup>	0.39±0.03 <sup>A,2</sup>	61.15±4.26 <sup>A</sup>	1.87±0.04 <sup>A,2</sup>
	20	413.98±8.51 <sup>A,2</sup>	79.37±1.99 <sup>A</sup>	0.26±0.01 <sup>B,2</sup>	63.66±8.58 <sup>A</sup>	1.65±0.06 <sup>B,2</sup>

- พิจารณาในแถวแนวนอน ตัวอักษรพิมพ์เล็กต่างกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มคอมบูชาก่อนทำแห้ง ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
- พิจารณาในแถวแนวนอน ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ต่างกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มคอมบูชาหลังทำแห้ง ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
- พิจารณาในแถวแนวนอน ตัวเลขที่ต่างกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างตัวอย่างคอมบูชาก่อนทำแห้งและหลังทำแห้ง ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

#### 4.7 ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัส

หลังจากทำการเลือกอัตราส่วนที่เหมาะสมของเชื้อแบคทีเรียต่อยีสต์, ชาดำต่อกระเจี๊ยบ และ ปริมาณสารมอลโตเดกซ์ทรินที่ใช้แล้ว นำตัวอย่างจำนวน 3 ตัวอย่าง คือ คอมบูชาจากชาดำ (C10R0) หมักด้วยหัวเชื้อแบคทีเรียต่อยีสต์ (B8Y2) (ตัวอย่างที่ 1) คอมบูชาจากชาดำผสมกระเจี๊ยบ (C8R2) หมักด้วยหัวเชื้อแบคทีเรียต่อยีสต์ (B8Y2) (ตัวอย่างที่ 2) และคอมบูชาจากชาดำผสมกระเจี๊ยบ (C8R2) หมักด้วยหัวเชื้อแบคทีเรียต่อยีสต์ (B8Y2) ผสมกับมอลโตเดกซ์ทรินร้อยละ 15 โดยน้ำหนักต่อ ปริมาตร นำไปผ่านกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งแล้วนำมาคืนรูปให้เป็นของเหลว (ตัวอย่างที่ 3)

ทำการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส และความพึงพอใจด้วยวิธี 9-Point Hedonic scale ในด้าน ความใส สี กลิ่น รสชาติ และความชอบโดยรวม โดยให้คะแนน 1 - 9 (ไม่ชอบมากที่สุด - ชอบมากที่สุด) ขณะทดสอบชิมผู้เข้าร่วมทดสอบต้องดื่มน้ำเปล่าทุกครั้งก่อนชิมตัวอย่างถัดไป ทำ การประเมินในกลุ่มนักศึกษาอายุระหว่าง 19 - 25 ปี ที่มีความสนใจในเครื่องดื่มสุขภาพ จำนวน 30 คน ซึ่งผลการสำรวจแสดงดังรูปที่ 4.20

ตารางที่ 4.23 ผลคะแนนการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของเครื่องดื่มคอมบูชา

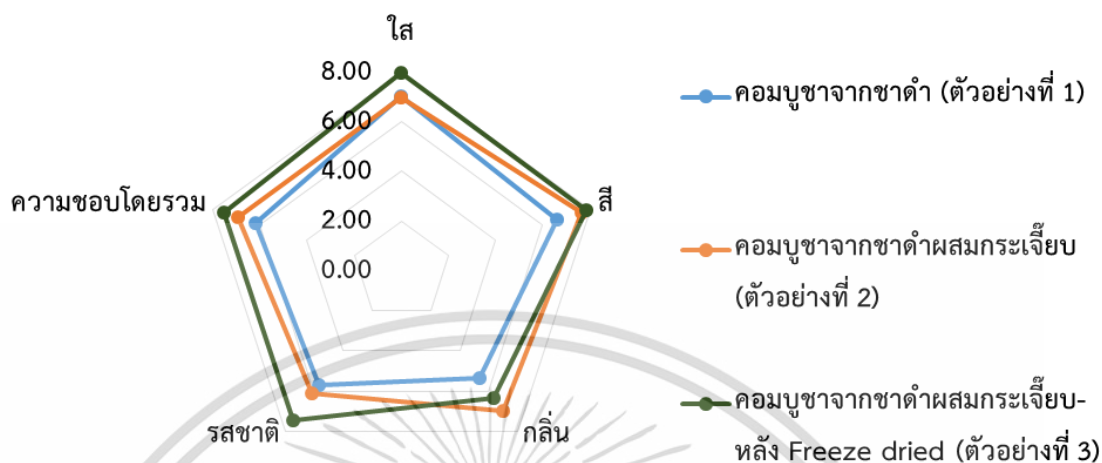
	คอมบูชาจากชาดำ (ตัวอย่างที่ 1)	คอมบูชาจากชาดำ ผสมกระเจี๊ยบ (ตัวอย่างที่ 2)	คอมบูชาจากชาดำผสม กระเจี๊ยบ-หลัง Freeze dried (ตัวอย่างที่ 3)
ความใส	7.03 ± 1.33 <sup>b</sup>	7.00 ± 1.08 <sup>b</sup>	7.97 ± 0.77 <sup>a</sup>
สี	6.60 ± 1.45 <sup>b</sup>	7.63 ± 1.00 <sup>a</sup>	7.87 ± 1.01 <sup>a</sup>
กลิ่น	5.33 ± 2.31 <sup>b</sup>	7.00 ± 1.72 <sup>a</sup>	6.33 ± 1.75 <sup>a</sup>
รสชาติ	5.70 ± 2.15 <sup>b</sup>	6.13 ± 1.81 <sup>b</sup>	7.47 ± 1.55 <sup>a</sup>
ความชอบโดยรวม	6.17 ± 1.88 <sup>b</sup>	6.93 ± 1.34 <sup>a</sup>	7.53 ± 1.07 <sup>a</sup>

พิจารณาในแถวแนวนอน อักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95

##### 4.7.1 ด้านความใส

จากตารางที่ 4.23 ผลการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสในด้านความใสพบว่าตัวอย่าง ผงคอมบูชาที่นำถูกนำมาคืนรูปเป็นเครื่องดื่มคอมบูชา (ตัวอย่างที่ 3) มีคะแนนความใสเท่ากับ 7.97 ซึ่งสูงกว่าคอมบูชาจากชาดำและคอมบูชาจากชาดำผสมกระเจี๊ยบ (ตัวอย่างที่ 1 และ 2) ซึ่งมีคะแนน ความใสใกล้เคียงกันเท่ากับ 7.03 และ 7.00 ตามลำดับ แนวโน้มคะแนนประเมินด้านความใส

ของคอมบูชาสอดคล้องกับคะแนนประเมินความใสของซูปผักที่ผ่านการแช่เยือกแข็งและนำไปคั้นรูป โดยภายหลังคั้นรูปมีคะแนนความใสสูงกว่าซูปที่เตรียมสด (Jakubczyk and Jaskulska, 2021)



รูปที่ 4.20 คะแนนการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของคอมบูชาจากชาดำ คอมบูชาจากชาดำผสมกระเจี๊ยบ และผงคอมบูชาจากชาดำผสมกระเจี๊ยบ

#### 4.7.2 ด้านสี

คะแนนการประเมินคุณภาพในด้านสีของคอมบูชาพบว่าคอมบูชาจากชาดำผสมกระเจี๊ยบที่ไม่ผ่านการทำแห้ง และที่ผ่านการทำแห้งมีคะแนนด้านสีสูงกว่าคอมบูชาจากชาดำ อาจเนื่องมาจากคอมบูชาผสมกระเจี๊ยบทั้งก่อนและหลังทำแห้ง มีสีแดงจากกระเจี๊ยบซึ่งได้รับการยอมรับจากผู้บริโภคมากกว่าสีน้ำตาลซึ่งพบในคอมบูชาจากชาดำ ซึ่งการผสมสมุนไพรหรือผลไม้ที่มีสีจะช่วยปรับปรุงคุณภาพด้านสี สอดคล้องกับงานวิจัยของ Osiripan and Apisittiwong (2021) รายงานว่าคอมบูชาจากชาอู่หลงผสมน้ำทับทิม และคอมบูชาจากชาอู่หลงผสมน้ำสับปะรดมีคะแนนการยอมรับด้านสีสูงกว่าคอมบูชาผสมน้ำแอปเปิ้ล โดยผงคอมบูชาจากชาดำผสมกระเจี๊ยบที่ถูกนำมาคั้นรูป (ตัวอย่างที่ 3) มีคะแนนสูงที่สุดเท่ากับ 7.87 คอมบูชาจากชาดำผสมกระเจี๊ยบ (ตัวอย่างที่ 2) มีคะแนน 7.63 และคอมบูชาจากชาดำมีคะแนนด้านสีต่ำสุดเท่ากับ 6.60 แสดงดังตารางที่ 4.23

#### 4.7.3 ด้านกลิ่น

คอมบูชาจากชาดำผสมกระเจี๊ยบที่ไม่ผ่านการทำแห้ง (ตัวอย่างที่ 2) มีคะแนนการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นสูงที่สุดเท่ากับ 7.00 รองลงมาเป็นผงคอมบูชาจากชาดำผสมกระเจี๊ยบที่นำมาคั้นรูป (ตัวอย่างที่ 3) มีคะแนนเท่ากับ 6.33 โดยคอมบูชาจากชาดำได้คะแนนด้านกลิ่นน้อยที่สุดเท่ากับ 5.33 แสดงดังตารางที่ 4.23 คะแนนการประเมินคุณภาพด้านกลิ่นของคอมบูชาจากชาดำผสมกระเจี๊ยบที่ไม่ผ่านการทำแห้งได้คะแนนสูงที่สุดอาจเนื่องมาจาก ตัวอย่างนี้ไม่ได้ผ่าน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระบวนการที่ทำให้ผลิตภัณฑ์สูญเสียกลิ่นไป เพราะเมื่อทำเป็นผงแห้ง (ตัวอย่างที่ 3) พบว่าคะแนนด้านกลิ่นลดลง และคอมบูชาจากชาดำได้คะแนนประเมินด้านกลิ่นน้อยที่สุด

คอมบูชาจากชาดำผสมกระเจี๊ยบมีคะแนนด้านกลิ่นสูงแต่มีคะแนนด้านรสชาติต่ำกว่าผงคอมบูชาจากชาดำผสมกระเจี๊ยบที่นำมาคืนรูป อาจเนื่องมาจากระหว่างกระบวนการทำแห้งสารระเหยต่างๆ ที่อยู่ในคอมบูชา เช่น กรดอินทรีย์ หรือสารที่ให้กลิ่นรสอื่นๆ ระเหยออกจากตัวอย่างทำให้ผงคอมบูชาจากชาดำผสมกระเจี๊ยบที่นำมาคืนรูปมีกลิ่นน้อยกว่าคอมบูชาจากชาดำผสมกระเจี๊ยบที่ไม่นำไปทำแห้ง สอดคล้องกับการศึกษาของ Zhang *et al.*, (2020) แสดงให้เห็นว่าภายหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง กรดอินทรีย์ และสารระเหยต่างๆ ในผงน้ำหมักถูกย้อมมีค่าลดลง

#### 4.7.4 ด้านรสชาติ

การประเมินคุณภาพด้านรสชาติพบว่าผงคอมบูชาจากชาดำผสมกระเจี๊ยบที่นำมาคืนรูป (ตัวอย่างที่ 3) มีคะแนนด้านรสชาติสูงที่สุดเท่ากับ 7.47 รองลงมาเป็นคอมบูชาจากชาดำผสมกระเจี๊ยบ (ตัวอย่างที่ 2) มีคะแนน 6.13 ตามด้วยคอมบูชาจากชาดำมีคะแนนประเมินด้านรสชาติเท่ากับ 5.70 แสดงดังตารางที่ 4.23

#### 4.7.5 ความชอบโดยรวม

ผงคอมบูชาจากชาดำผสมกระเจี๊ยบที่นำมาคืนรูป (ตัวอย่างที่ 3) มีคะแนนความชอบโดยรวมสูงที่สุดเท่ากับ 7.53 รองลงมาเป็นคอมบูชาจากชาดำผสมกระเจี๊ยบและคอมบูชาจากชาดำซึ่งมีคะแนนความชอบโดยรวมเท่ากับ 6.93 และ 6.17 ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 4.23

จากผลการประเมินที่ได้พบว่าคอมบูชาที่มีการผสมกระเจี๊ยบแดงมีคะแนนประสาทสัมผัสด้านกลิ่น รสชาติ สี สูงกว่าคอมบูชาจากชาดำ การผสมสมุนไพรสามารถช่วยเพิ่มคุณภาพด้านประสาทสัมผัสของคอมบูชาได้ สอดคล้องกับการศึกษาของ Shabazi *et al.*, (2018) รายงานผลการทดสอบด้านประสาทสัมผัสของคอมบูชาจากชาเขียวที่มีการผสมสมุนไพร อบเชย กระวาน และโรส เปรียบเทียบกับคอมบูชาจากชาเขียว ผลการประเมินทางด้านประสาทสัมผัสพบว่าผู้ทดสอบชิมให้คะแนนคอมบูชาที่ผสมอบเชยในด้านกลิ่น รสชาติ ความเปรี้ยว สี และความชอบโดยรวมสูงกว่าคอมบูชาจากชาเขียว นอกจากนี้คอมบูชาจากกระวานก็ให้ผลการทดสอบในแง่บวกด้านกลิ่น สี และรสชาติเช่นกัน และจากรายงานของ Osiripan and Apisittiwong (2021) ผลการทดสอบด้านประสาทสัมผัสของคอมบูชาจากชาอู่หลงผสมน้ำแอปเปิ้ล น้ำทับทิม และน้ำสับปะรด ด้วยวิธี 9-point hedonic scale พบว่าคอมบูชาจากชาอู่หลงผสมน้ำแอปเปิ้ลและ คอมบูชาผสมน้ำสับปะรดมีการยอมรับโดยรวมสูง

## บทที่ 5

# สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

### 5.1 สรุปผลการวิจัย

1. การศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ที่นำมาใช้ในการหมักคอมบูชา โดยทำการเติมเชื้อแบคทีเรีย *Acetobacter pasteurianus* AJ605 และเชื้อยีสต์ *Zygosaccharomyces bailii* YN403 ที่เลี้ยงในอาหารซาด้าหวานเป็นเวลา 10 วัน โดยมี 6 อัตราส่วนได้แก่ 10:0 8:2 6:4 5:5 4:6 2:8 และ 0:10 ลงในซาด้าหวาน พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *A. pasteurianus* AJ605 มีการเพิ่มจำนวนได้อย่างต่อเนื่อง ในขณะที่เชื้อยีสต์ *Z. bailii* YN403 เจริญอย่างรวดเร็วในวันที่ 3 และการเจริญช้าลงในวันที่ 7 และ 10 ของการหมัก การเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางเคมี สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมีการเปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาการหมัก เชื้อแบคทีเรีย *A. pasteurianus* AJ605 และเชื้อยีสต์ *Z. bailii* YN403 มีการใช้น้ำตาลซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณเอทานอลที่เพิ่มขึ้น ปริมาณกรดทั้งหมด (ในรูปกรดอะซิติก) เพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับค่าพีเอชที่ลดลง เมื่อพิจารณาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด พบว่ามีปริมาณเพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ 7 และลดลงเล็กน้อยในวันที่ 10 ขณะที่ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS มีค่าเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนถึงสิ้นสุดกระบวนการหมัก (10 วัน) คอมบูชาหมักด้วยเชื้อแบคทีเรีย *A. pasteurianus* AJ605 และเชื้อยีสต์ *Z. bailii* YN403 อัตราส่วน 8:2 มีค่า  $IC_{50}$  ของ DPPH และ ABTS เท่ากับ  $2.84 \pm 0.21$  มิลลิกรัมสมมูลกรดแอสคอร์บิกต่อมิลลิลิตร และ  $2.37 \pm 0.03$  มิลลิกรัมสมมูลโทรลอคซ์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ รองลงมาคืออัตราส่วน 6:4 เท่ากับ  $2.67 \pm 0.06$  มิลลิกรัมสมมูลกรดแอสคอร์บิกต่อมิลลิลิตร และ  $2.24 \pm 0.08$  มิลลิกรัมสมมูลโทรลอคซ์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากการวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ พบว่าคอมบูชาจากซาด้าที่หมักด้วยเชื้อแบคทีเรีย *A. pasteurianus* AJ605 และเชื้อยีสต์ *Z. bailii* YN403 อัตราส่วน 8:2 เป็นเวลา 10 วัน มีคุณภาพทางเคมีและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเหมาะสมที่จะนำไปปรับปรุงคุณภาพด้วยการผสมกระเจี๊ยบต่อไป

2. การศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของกระเจี๊ยบเพื่อปรับปรุงคุณภาพของคอมบูชาที่หมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์ โดยทำการผสมซาด้ากับกระเจี๊ยบแดงในอัตราส่วน 10:0 8:2 7:3 6:4 5:5 และ 0:10 เป็นเวลา 10 วัน พบว่า กระเจี๊ยบมีผลต่อคุณภาพทางเคมีของคอมบูชา ทั้งนี้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและแอนไซยานิน รวมทั้งความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมาจากซาด้าเป็นหลัก ที่ระยะเวลาหมัก 10 วัน คอมบูชาจากซาด้าผสมกระเจี๊ยบอัตราส่วน 8:2 มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS สูง โดยมีค่า  $IC_{50}$   $3.06 \pm 0.07$  มิลลิกรัมสมมูลกรดแอสคอร์บิกต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิลลิลิตร และ  $3.44 \pm 0.22$  มิลลิลิตรสมมูลโทรลอกซ์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังนั้นคอมบูชาจากชาดำผสมกระเจี๊ยบอัตราส่วน 8:2 หมักเป็นเวลา 10 วัน มีคุณสมบัติเหมาะสมที่จะนำไปผลิตเป็นเครื่องดื่มต่อไป

3. ศึกษาการพัฒนาเครื่องดื่มคอมบูชาด้วยการแปรรูปเป็นผงเครื่องดื่ม โดยใช้วิธีการผสมกับมอลโตเด็กซ์ทรินซึ่งเป็นสารช่วยทำแห้ง และนำไปทำแห้งด้วยวิธีการแช่เยือกแข็ง พบว่าภายหลังการทำแห้งความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระลดลง มีการลดลงของปริมาณกรดทั้งหมด (ในรูปของกรดอะซิติก) และปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดและแอนโทไซยานิน โดยคอมบูชาจากชาดำผสมกระเจี๊ยบที่ผสมมอลโตเด็กซ์ทรินร้อยละ 15 สามารถรักษาสารประกอบชีวภาพเหล่านี้ได้ดี และยังสามารถใช้ในการต้านอนุมูลอิสระสูง

4. หลังจากการศึกษาการพัฒนาเครื่องดื่มด้วยการแปรรูปเป็นผง ทำการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสโดยเปรียบเทียบระหว่าง คอมบูชาจากชาดำ คอมบูชาจากชาดำผสมกระเจี๊ยบที่ไม่ผ่านการทำแห้ง และผงคอมบูชาจากชาดำผสมกระเจี๊ยบนำมาละลายเพื่อคืนรูป พบว่าผู้บริโภคส่วนใหญ่ให้คะแนนความชอบและความพึงพอใจในผงคอมบูชาจากชาดำผสมกระเจี๊ยบที่นำมาละลาย โดยได้รับคะแนนสูงสุดทั้งในด้าน ความใส สี กลิ่น รสชาติ และความชอบโดยรวม นอกจากนี้จากการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส ชี้ให้เห็นว่ากระเจี๊ยบแดงสามารถใช้ผสมกับชาดำ เพื่อเพิ่มคุณสมบัติด้านประสาทสัมผัสในการหมักคอมบูชาได้

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

1. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและแอนโทไซยานินรวมทั้งสารที่ผลิตจากเชื้อจุลินทรีย์ อาจทำการวิเคราะห์เพิ่มเติมด้วยวิธี High-performance liquid chromatography (HPLC) เพื่อนำไปสู่การศึกษาเชิงลึกในกระบวนการหมักคอมบูชาด้วยเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ต่อไป

2. ทำการศึกษาการใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก เพื่อเพิ่มประโยชน์ของเครื่องดื่มคอมบูชานอกจากความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดยสามารถพัฒนาเครื่องดื่มคอมบูชาให้มีประโยชน์ต่อสุขภาพเพิ่มขึ้น

3. ศึกษาชนิดของสารที่ช่วยทำแห้ง โดยเป็นสารในกลุ่มพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก เพื่อเพิ่มประโยชน์ของเครื่องดื่มคอมบูชา และหากใช้ร่วมกับจุลินทรีย์โพรไบโอติก จะสามารถเพิ่มประโยชน์ให้กับเครื่องดื่มได้มากขึ้น

4. หากมีการทดสอบชิมเครื่องดื่มในลักษณะเดียวกับการทดลองนี้ ควรระวังเรื่องค่า pH ที่ต่ำและปริมาณน้ำตาลในผู้ที่ปัญหาสุขภาพ

5. ศึกษาอายุการเก็บรักษาผงเครื่องดื่ม โดยเน้นการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท เพื่อให้สามารถจำหน่ายเข้าสู่ท้องตลาดได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง

กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์ และ สมจิตร ปาละภาศ. 2557. “การตรวจสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาใบขลุ่ย และผลของระยะเวลาการเก็บรักษาต่อความสามารถในการออกฤทธิ์.” รายงานการวิจัยฉบับ นันทินิตย์ คงวัน. 2559. “การผลิตเครื่องดื่มชนิดผงจากน้ำส้มสายชูหมักผสมน้ำผลไม้.” การประชุม วิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยรังสิต, 29 เมษายน 2559 มหาวิทยาลัยรังสิต. ปทุมธานี.

ปิยวรรณ วัชรอาภาไพบูลย์ ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ และ ดวงใจ โอชัยกุล. 2562. “การคัดแยกและ คัดเลือกยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกจากชาหมักคอมบูชา.” การประชุมวิชาการระดับชาติ “วิทยาศาสตร์วิจัย” ครั้งที่ 11, 23-24 พฤษภาคม 2562 มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. กรุงเทพมหานคร.

ปิยวรรณ วัชรอาภาไพบูลย์. 2562. “การคัดแยกและจัดจำแนกเชื้อยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกจากชา คอมบูชาเพื่อการผลิตคอมบูชา.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขา เทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. สมบูรณ์ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. 2556. มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน 1460/2556 กระเจี๊ยบ แดงแห้งขงต้ม. กรุงเทพฯ : กระทรวงอุตสาหกรรม.

สุนทรีย์ วราอุบล. 2537. “การทำแห้งมะนาวแบบเยือกแข็ง.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร บัณฑิตวิทยาลัย, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

โอภา วัชรคุปต์ ปรีชา บุญจูง จันทนา บุญรัตน์ และมาลีรักษ์ อัดต์สินทอง. 2550. สารต้านอนุมูล ออิสระ. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : นิเวศมิตรการพิมพ์.

A.O.A.C., 2000. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemist. EUA.

Alam, M.N. Bristi, N.J. and Rafiquzzaman, Md. 2013. “Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity.” *Saudi Pharmaceutical Journal*. 21 : 143-152.

Amarasinghe, H. Nimsha, S. Weerakkod, S.N. and Waisundara, Y.V. 2018. “Evaluation of physicochemical properties and antioxidant activities of kombucha “Tea Fungus” during extended periods of fermentation.” *Food Science and Nutrition*. 6 : 659–665.

Amaya-Cruz, D. Perez-Ramirez, I. F. Perez-Jimenez, J. Nava, G.M. and Reynoso-Camacho, R. 2019. “Comparison of the bioactive potential of Roselle (*Hibiscus sabdariffa*

- L.) calyx and its by-product: Phenolic characterization by UPLC-QTOF MS(E) and their anti-obesity effect in vivo.” *Food Research International*. 126 : 108589.
- Atta, E.M. Mohamed, N.H. and Abdelgawa, A.A.M. 2017. “Antioxidants: an overview on the natural and synthetic types.” *European Chemical Bulletin*. 6(8) : 365-375.
- Azevedo, R.S.A. Bianca, S.T. Sauthier, M.C.S. Santana, M.V.A. Santos, W.N.L. and Santana, D.A. 2019. “Multivariate analysis of the composition of bioactive in tea of the species *Camellia sinensis*.” *Food Chemistry*. 273 : 39–44.
- Azhara, S.H.M. Rabdulla, R. Jambo, S.A. Marbawia, H. Gansau, J.A. Faika, A.A.M. and Rodrigues, K.F. 2017. “Yeasts in sustainable bioethanol production : A review.” *Biochemistry and Biophysics Reports*. 10 : 52–61.
- Bansal, S. Choudhary, S. Sharma, M. Kumar, S.S. Lohan, S. Bhardwaj, V. Syan, N. and Jyoti, S. 2013. “Review Tea: A native source of antimicrobial agents.” *Food Research International*. 53 : 568–584.
- Bellut, K. Michel, M. Zarnkow, M. Hutzler, M. Jacob, F. Schutter, D.P. Daenen, L. Lynch, K.M. Zannini, E. and Arendt, E.K. 2018. “Application of Non-*Saccharomyces* yeasts isolated from kombucha in the production of alcohol-free beer.” *Fermentation*. 4(3) : 66.
- BeMiller, J.N. 2019. **Carbohydrate Chemistry for Food Scientists**. 3<sup>rd</sup>ed. Canada : AACC International Press.
- Bhatta, S. Janezic, T.S. and Ratti, C. 2020. “Review freeze-drying of plant-based foods.” *Foods*. 9 : 87.
- Biyik, H. and Coban, E.P. 2017. “Evaluation of different carbon, nitrogen sources and industrial wastes for bacterial cellulose production.” *European Journal of Biotechnology and Bioscience*. 5(1) : 74-80.
- Blois, M.S. 1958. “Antioxidant determinations by the use of a stable free radical.” *Nature*. 181(4617) : 1199-1200.
- Caili, F. Fen, Y. Zeli, C. Fanying, X. and Juan, L. 2014. “Antioxidant activities of kombucha prepared from three different substrates and changes in content of probiotics during storage.” *Food Science and Technology*. 34(1) : 123-126.

- Caliskan, G. and Dirim S.N. 2015 “The effect of different drying processes and the amounts of maltodextrin addition on the powder properties of sumac extract powders.” *Powder Technology*. 28: 308-314.
- Cardoso, R.R. Neto, R.O. D'Almeid, C.T.S. Nascimento, T.P. Pressete, C.G. Azevedo, L. Martino, H.S.D. Cameron, L.C. Ferreira, M.S.L. and Barrosa, F.A.R. 2020. “Kombucha from green and black teas have different phenolic profile, which impacts their antioxidant capacities, antibacterial and antiproliferative activities.” *Food Research International*. 128 : 108782.
- Chakravorty, S. Bhattacharya, S. Chatzinotas, A. Chakraborty, W. Bhattacharya, D. and Gachhui, R. 2016. “Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics.” *International Journal of Food Microbiology*. 220 : 63-72.
- Chan, E.W.C. Lim, Y.Y. and Chew, Y.L. 2006. “Antioxidant activity of *Camellia sinensis* leaves and tea from a lowland plantation in Malaysia.” *Food Chemistry*. 102(4) : 1214-1222.
- Chan, E.W.C. Soh, E.Y. Tie, P.P. and Law, Y.P. 2011. “Antioxidant and antibacterial properties of green, black, and herbal teas of *Camellia sinensis*.” *Pharmacognosy Research*. 3(4) : 266-272.
- 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.
- Chen, Y.C. Lan, H.L. Chen, W.C. Wu, C.H. and Wu, C.W. 2010, “Effect of deep sea water (DSW) Nigari on the alcohol production of yeasts fermented in acidic roselle extract.” *American Society of Brewing Chemists*. 68(3): 160-166.
- Chidambara Murthy, K.N. Jayaprakasha, G.K. and Singh, R.P. 2002. “Studies on antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel extract using in vivo models.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(17) : 4791-4795.
- Chu, S.C. and Chen, C. 2006. “Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of kombucha.” *Food Chemistry*. 98 : 502-507.
- Cirillo, G. and lemma, F. 2012. **Antioxidant polymers synthesis, properties, and applications**. United State of America : *Scrivener Publishing LLC*.

- Coton, M. Pawtowski, A. Taminiau, B. Burgaud, G. Deniel, F. Coulloume-Labarthe, L. Fall, A. Daube, G. and Coton, E. 2017. "Unraveling microbial ecology of industrial-scale kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods" *FEMS Microbiology Ecology*. 93(5) : 1-16.
- Da-Costa-Rocha, I. Bonnlaender, B. Sievers, H. Pischel, I. and Heinrich, M. 2014. "*Hibiscus sabdariffa* L. – A phytochemical and pharmacological review." *Food Chemistry*. 165 : 424–443.
- Dato, L. Sauer, M. Passolunghi, S. Porro, D. and Branduardi, P. 2008 "Investigating the multibudded and binucleate phenotype of the yeast *Zygosaccharomyces bailii* growing on minimal medium." *FEMS Yeast*. 8 : 906–915.
- Denisov, E.T. and Afanasev, I.B. 2006. **Oxidation and antioxidant in organic chemistry and biology**. Germany : WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA,
- Dubois, M. Gilles, K.A. Hamilton, J.K. Rebers, P.A. and Smith, F. 1956. "Colorimetric method for determination of sugars and related substances." *Analytical Chemistry*. 28(3) : 350-356.
- Dufresne, C. and Farnworth, E. 2000. "Tea, Kombucha, and health: a review." *Food Research International*. 33(6) : 409-421.
- Estupinan-Amaya, M. Fuenmayor, C.A. and Lopez-Cordoba, A. 2020. "New freeze-dried Andean blueberry juice powders for potential application as functional food ingredients: Effect of maltodextrin on bioactive and morphological features." *Molecules*. 25 : 5635.
- Friedman, M. Henika, P.R. Levin, C.E. Mandrell, R.E. and Kozukue, N. 2006. "Antimicrobial activities of tea catechins and theaflavins and tea extracts against *Bacillus cereus*." *Journal of Food Protection*. 69(2) : 354-361.
- Fu, C. Yan, F. Cao, Z. Xie, F. and Lin, J. 2014. "Antioxidant activities of kombucha prepared from three different substrates and changes in content of probiotics during storage." *Food Science and Technology*. 34(1) : 123-126.
- Gaggia, F. Baffoni, L. Galiano, M. Nielsen, D.S. Jakobsen, R.R. Castro-Mejia, J.L. and Di Gioia, D. 2019. "Kombucha beverage from green, black and rooibos teas: A comparative study looking at microbiology, chemistry and antioxidant activity." *Nutrients*. 11(1).

- Goh, W.N. Rosma, A. Kaur, B. Fazilah, A. Karim, A.A. and Bhat, R. 2012.” Fermentation of black tea broth (Kombucha): I. Effects of sucrose concentration and fermentation time on the yield of microbial cellulose.” *International Food Research Journal*. 19(1) : 109-117.
- Greenwalt, C.J. Steinkraus, K.H. and Ledford, R.A. 2000. “Kombucha the fermented tea: Microbiology, composition, and claimed health effects.” *Journal of Food Protection*. 63 : 976-981.
- Grotewold, E. 2006. **The science of flavonoids**. United State of America : *Springer*.
- Ha, J.H. Nasrullah Shah, N. Ul-Islam, M. Khan, T. and Park, J.K. 2011. “Bacterial cellulose production from a single sugar  $\alpha$ -linked glucuronic acid-based oligosaccharide.” *Process Biochemistry*. 46 : 1717–1723.
- Habtemariam, S. 2019. **Medicinal Foods as Potential Therapies for Type-2 Diabetes and Associated Diseases**. United Kingdom : *Academic Press*.
- Harnkarnsujarit, N. Charoenrein, S. and Roos, Y.H. 2012. “Microstructure formation of maltodextrin and sugar matrices in freeze-dried systems.” *Carbohydrate Polymers*. 88 : 734– 742.
- Herald, T.J. Gadgil, P. and Tilley, M. 2012. “High-throughput microplate assays for screening flavonoid content and DPPH-scavenging activity in sorghum bran and flour.” *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 92(11) : 2326-2331.
- Hinton-Shele, P. 2018. Microbiology and quality assurance of kombucha. [Online]. Available : <https://www.news-medical.net/life-sciences/Microbiology-of-Kombucha.aspx>.
- Huang, D. Ou, B. and Prior, R.L. 2005. “The chemistry behind antioxidant capacity assays.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53 : 1841-1856.
- Jakubczyk, E. and Jaskulska, A. 2021. “The effect of freeze-drying on the properties of polish vegetable soups.” *Applied Sciences*. 11(2) : 654.
- Jakubczyk, K. Kaldunska, J. Kochman, J. and Janda, K. 2020. “Chemical profile and antioxidant activity of the kombucha beverage derived from white, green, black and red tea.” *Antioxidants*. 9(5) : 447.
- James A.S. and Stratford, M. 2011. **The Yeasts**. 5<sup>th</sup>ed. United Kingdom : *Elsevier*.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Jayabalan, R. Malbasá, R.V. Lonćar E.S. Vitas, J.S. and Sathishkumar, M. 2014. "A review on kombucha tea – microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 13 : 538-550.
- Jayabalan, R. Malini, K. Sathishkumar, M. Swaminathan, K. and Yun, S.E. 2010. "Biochemical characteristics of tea fungus produced during kombucha fermentation." *Food Science and Biotechnology*. 19(3) : 1-5.
- Jayabalan, R. Marimuthu, S. and Swaminathan, K. 2007. "Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation." *Food Chemistry*. 102(1) : 392-398.
- Jayabalan, R. Subathradevi, P. Marimuthu, S. Sathishkumar, M. and Swaminathan, K. 2008. "Changes in free radical scavenging ability of kombucha tea during fermentation." *Food Chemistry*. 109 : 227-234.
- John, K.M.M. Thiruvengadam, M. Enkhtaivan, G. and Kim, D.H. 2014. "Variation in major phenolic compounds and quality potential of CTC black tea elicited by *Saccharomyces cerevisiae* and its correlation with antioxidant potential." *Industrial Crops and Products*. 55 : 289-294.
- Kaewkod, T. Bovonsombut, S. and Tragoolpua, Y. 2019. "Efficacy of kombucha obtained from green, oolong, and black teas on inhibition of pathogenic bacteria, antioxidation, and toxicity on colorectal cancer cell line." *Microorganisms*. 7 : 700.
- Kanchanarach, W. Theeragool, G. Inoue, T. Yakushi, T. Adachi, O. and Matsushita, K. 2010. "Acetic acid fermentation of *Acetobacter pasteurianus*: Relationship between acetic acid resistance and pellicle polysaccharide formation." *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 74(8) : 1591-1597.
- Kim, K.H. Cho, G.Y. Chun, B.H. Weckx, S. Moon, J.Y. Yeo, S.H. and Jeon, C.O. 2018. "*Acetobacter oryzafermentans* sp. nov., isolated from Korean traditional vinegar and reclassification of the type strains of *Acetobacter pasteurianus* subsp. *ascendens* (Henneberg 1898) and *Acetobacter pasteurianus* subsp. *paradoxus*

- (Frateur 1950) as *Acetobacter ascendens* sp. nov., comb. nov.” *Systematic and Apply Microbiology*. 41(4) : 324-332.
- Kumar, V. and Joshi, V. 2016. “Kombucha: technology, microbiology, production, composition and therapeutic value.” *International Journal of Food and Fermentation Technology*. 6(1) : 1-24.
- Lahiry, L. Saha, B. Chakraborty, J. Bhattacharyya, S. Chattopadhyay, S. Banerjee, S. and Das, T. 2008. “Contribution of p53-mediated Bax transactivation in theaflavin induced mammary epithelial carcinoma cell apoptosis.” *Apoptosis*. 13(6) : 771-781.
- Laokuldilok, T. and Kanha, N. 2015. “Effects of processing conditions on powder properties of black glutinous rice (*Oryza sativa* L.) bran anthocyanins produced by spray drying and freeze drying.” *LWT - Food Science and Technology*. 64 : 405-411.
- Li, J. Jiaqin Wang, J. Yao, Y. Hua, J. Zhou, Q. Jiang, Y. Deng, Y. Yang, Y. Wang, J. Yuan, H. and Dong, C. 2020. “Phytochemical comparison of different tea (*Camellia sinensis*) cultivars and its association with sensory quality of finished tea.” *LWT - Food Science and Technology*. 117 : 108595.
- Li, S. Chen, G. Zhang, C. Wu, M. Wu, S and Liu Q. 2014. “Research progress of natural antioxidants in foods for the treatment of diseases.” *Food Science and Human Wellness*. 3 : 110-116.
- 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(6) : 407-415.
- Maciel, L.G. do Carmo, M.A.V. Azevedo, L. Daguer, H. Molognoni, L. Almeida, M.M. and Rosso, N.D. 2018. “*Hibiscus sabdariffa* anthocyanins-rich extract: Chemical stability, in vitro antioxidant and antiproliferative activities.” *Food and Chemical Toxicology*. 113 : 187-197.
- Maksimovic, Z. Malencic, D. and Kovacevic, N. 2005. “Polyphenol contents and antioxidant activity of *Maydis stigma* extracts.” *Bioresource Technology*. 96(8) : 873-877.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Malbasá, R.V. Loncar, E.S. Vitas, J.S. and Canadanovic-Brunet, J.M. 2011. "Influence of starter cultures on the antioxidant activity of kombucha beverage." *Food Chemistry*. 127(4) : 1727-1731.
- Mamlouk, D. and Gullo, M. 2013. "Acetic Acid Bacteria: physiology and carbon sources oxidation." *Indian Journal of Microbiology*. 53(4) : 377-384.
- Marsh, A.J. O'Sullivan, O. Hill, C. Ross, R.P. and Cotter, P.D. 2014. "Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples." *Food Microbiology*. 38 : 171-178.
- Merico, A. Capitanio, D. Vigentini, I. Ranzi, B.M. and Compagno, C. 2003. "Aerobic sugar metabolism in the spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii*." *FEMS Yeast Research*. 4 : 277-283.
- Michalska, A. and Lech, K. 2018. "The effect of carrier quantity and drying method on the physical properties of apple juice powders." *Beverages*. 4 : 2.
- Michalska-Ciechanowska, A. Majerska, J. Brzezowska, J. Wojdylo, A. and Figiel, A. 2020. "The influence of maltodextrin and inulin on the physico-chemical of cranberry juice powder." *Chemical Engineering*. 4 : 12.
- Mosquera, L.H. Moraga, G. and Martinez-Navarrete, N. 2010. "Effect of maltodextrin on the stability of freeze-dried borojó (*Borojoa patinoi* Cuatrec.) powder." *Journal of Food Engineering*. 97 : 72-78.
- Muhalidin, B.J. Osman, F.A. Muhamad, R. Che Wan Sapawi, C.W.N.S. Anzian, A. Voon, W.W.Y. and Meor Hussin, A.S. 2018. "Effects of sugar sources and fermentation time on the properties of tea fungus (kombucha) beverage." *International Food Research Journal*. 26(2) : 481-487.
- Naderi, N.J. Niakan, M. Kharazi Fard, M.J. and Zardi, S. 2011. "Antibacterial activity of Iranian green and black tea on *Streptococcus mutans*: an in vitro study." *Journal of Dentistry*. 8(2) : 55-59.
- Naveed, M. BiBi, J. Kamboh, A.A. Suheryani, I. Kakar, I. Fazlani, S.A. FangFang, K. Ali kalhoru, S. Yunjuani, L. Kakarj, M.U. Abd El-Hack, M.E. Noreldin, A.E. Shi Zhixiang, S. LiXi, C. and XiaoHui, Z. 2018. "Pharmacological values and therapeutic

- properties of black tea (*Camellia sinensis*): A comprehensive overview.” *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 100 : 521–531.
- Nguyen, N.K. Nguyen, P.H. Nguyen, H.T. and Le, P.H. 2015. “Screening the optimal ratio of symbiosis between isolated yeast and acetic acid bacteria strain from traditional kombucha for high-level production of glucuronic acid.” *LWT – Food Science and Technology*. 64 : 1149-1155.
- Nowak, D. and Jakubczyk, E. 2020. “The freeze-drying of foods-The characteristic of the process course and effect of its parameters on the physical properties of food materials.” *Foods*. 9(10) : 1488.
- Oetjen, G.W. and Haseley, P. 2004. **Freeze-drying**. 2<sup>nd</sup> ed. Germany : WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Osiripan, V. and Apisittiwong, T. 2021. “Polyphenol and antioxidant activities of kombucha fermented from different teas and fruit juices.” *Journal of Current Science and Technology*. 11(2) : 188-196.
- Pallach, M. Lorenzo, F.D. Facchini, F.A. Gully, D. Giraud, E. Francesco Peri, F. Duda, K.A. Molinaro, A. and Alba Silipo, A. 2018. “Structure and inflammatory activity of the LPS isolated from *Acetobacter pasteurianus* CIP103108.” *International Journal of Biological Macromolecules*. 119 : 1027–1035.
- Pascual-Teresa, S. Moreno, D.A. and Garcia-Viguera, C. 2010. “Flavonols and anthocyanins in cardiovascular health: A review of current evidence.” *International Journal of Molecular Sciences*. 11 : 1679-1703.
- Pinto, M.S. 2013. “Tea-A new perspective on health benefits.” *Food Research International*. 53 : 558–567.
- Prasanth, M.I. Sivamaruthi, B.S. Chaiyavat Chaiyasut, C. and Tencomnao, T. 2019. “A review of the role of green tea (*Camellia sinensis*) in antiphotaging, stress resistance, neuroprotection, and autophagy.” *Nutrients*. 11: 474.
- Ramachandran, S. Fontanille, P. Pandey, A. and Larroche, C. 2006. “Gluconic acid : properties, applications and microbial production.” *Food Technology and Biotechnology*. 44(2) : 185–195.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Re, R. Pellegrini, N. Proteggente, A. Pannala, A. Yang, M. and Rice-Evans, C. 1999. "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay." *Free Radical Biology & Medicine*. 26(Nos. 9/10) : 1231–1237.
- Riaz, G. and Chopra, R. 2018. "A review on phytochemistry and therapeutic uses of *Hibiscus sabdariffa* L." *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 102 : 575–586.
- Rocha, I.D.C. Bonnlaender, B. Sievers, H. Pischel, I. and Heinrich, M. 2014. "*Hibiscus sabdariffa* L. – A phytochemical and pharmacological review." *Food Chemistry* 165 : 424–443.
- Rocha-Parra, D.F. Lanari, C.M. Zamora, M.C. and Chirife, J. 2016. "Influence of storage condition on phenolic compounds stability, antioxidant capacity and colour of freeze-dried encapsulated red wine." *Food Science and Technology*. 70 : 162–170.
- Rodrigues, F. Corte-Real, M. Leao, C. Dijken, J.P. and Pronk, J.T. 2001. "Oxygen requirements of the food spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii* in synthetic and complex media." *Applied and Environmental Microbiology*. 67(5) : 2123–2128.
- Rodrigues, F. Sousa, M.J. Ludovico, P. Santos, H. Corte-Real, M. and Leao, C. 2012. "The fate of acetic acid during glucose co-metabolism by the spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii*." *PLoS ONE*. 7(12) : e52402.
- Romero-Gonzalez, J. Ah-Hen, K.S. Lemus-Mondaca, R. and Munoz-Farina, O. 2020. "Total phenolics, anthocyanin profile and antioxidant activity of maqui, *Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz, berries extract in freeze dried polysaccharides microencapsules." *Food Chemistry*. 313 : 126115.
- Romero-González, J. Ah-Hen, K.S. Lemus-Mondaca, R. and Muñoz-Fariña, O. 2020. "Total phenolics, anthocyanin profile and antioxidant activity of maqui, *Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz, berries extract in freeze-dried polysaccharides microcapsules." *Food Chemistry*. 313 : 126115.
- Sainz, F. Navarro, D. Mateo, E. Torija, M.J. and Mas, A. 2016. "Comparison of D-gluconic acid production in selected strains of acetic acid bacteria." *International Journal of Food Microbiology*. 222 : 40–47.

- Sengun, I.L. and Karabiyikli, S. 2011. "Importance of acetic acid bacteria in food industry." *Food Control*. 22 : 647-656.
- Shahbazi, H. Gahrue, H.H. Golmakani, M.T. Eskandari, M.H. and Movahedi, M. 2018. "Effect of medicine plant type and concentration on physicochemical, antioxidant, antimicrobial, and sensorial properties of kombucha." *Food Science and Nutrition*. 6 : 2568-2577.
- Sievers, M. Lanini, C. Weber, A. Schuler-Schmid, U. and Teuber, M. 1995. "Microbiology and fermentation balance in a kombucha beverage obtained from a tea fungus fermentation." *Systematic and Applied Microbiology*. 18 : 590-594.
- Sukhaeng, S. Promdang, S. and Doung-ngern, U. 2018. "Fruit characters and physicochemical properties of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) in Thailand—A screening of 13 new genotypes." *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*. 11 : 47-53.
- Sun, T.Y. Li, J.S. and Chen, C. 2014. "Effects of blending wheatgrass juice on enhancing phenolic compounds and antioxidant activities of traditional kombucha beverage." *Journal of Food and Drug Analysis*. 23(4) : 709-718.
- Suravanichnirachorn, W. Haruthaithanasan, V. Suwonsichon, S. Sukatta, U. Maneeboon, T. and Chantrapornchai, W. 2018. "Effect of carrier type and concentration on the properties, anthocyanins and antioxidant activity of freeze-dried mao [*Antidesma bumius* (L.) Spreng] powders." *Agriculture and Natural Resources*. 52: 354-360.
- Teoh, A.L. Heard, G. and Cox, J. 2004. "Yeast ecology of kombucha fermentation." *International Journal of Food Microbiology*. 95(2) : 119-126.
- Tiefenbacher, K.F. 2017. **Technology of Main Ingredients—Water and Flours**. 1<sup>st</sup> ed. Austria : *Academic Press*.
- Tkacz, K. Wojdylo, A. Michalska-Cienchanowska, A. Turkiewicz, I.P. Lech, K. and Nowicka, P. 2020. "Influence carrier agents, drying methods storage time on physicochemical properties and bioactive potential of encapsulated sea buckthorn juice powders." *Molecules*. 25: 3801.

- Tran, T. Grandvalet, C. Verdier, F. Martin, A. Alexandre, H. and Tourdot-Marechal, R. 2020. "Microbial dynamics between yeasts and acetic acid bacteria in kombucha: Impacts on the chemical composition of baverage." *Foods*. 9 : 963.
- Tsai, P.J. McIntosh, J. Pearce, P. Camden, B. and Jordan, B.R. 2002. "Anthocyanin and antioxidant capacity in Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract." *Food Research International*. 35 : 351–356.
- Velićanski, A.S. Cvetković, D.D. Markov, S.L. Saponjac, V.T.T. and Vulić, J.J. 2014. "Antioxidant and antibacterial activity of the beverage obtained by fermentation of sweetened lemon balm (*Melissa officinalis* L.) tea with symbiotic consortium of bacteria and yeasts." *Food Technology and Biotechnology*. 52(4) : 420-429.
- Vertuani, S. Angusti, A. and Manfredini, S. 2004. "The Antioxidants and Pro-Antioxidants Network: An Overview." *Current Pharmaceutical Design*. 10 : 1677-1694.
- Villarreal-Soto, S.A. Beaufort, S. Bouajila, J. Souchard, J.P. Renard, T. Ronan, S. and Taillandier, P. 2019. "Impact of fermentation conditions on the production of bioactive compounds with anticancer, anti-inflammatory and antioxidant properties in kombucha tea extracts." *Process Biochemistry*. 83 : 44-54.
- Wang, S. Zhang, L. Qi, L. Liang, H. Lin, X. Li, S. Yu, C. and Ji, C. 2020. "Effect of synthetic microbiology community on neutraceutical and sensory qualities of kombucha." *International Journal of Food Science and Technology*. 55(10) : 3327-3333.
- Wu, H.Y. Yang, K.H. and Chiang, P.Y. 2018. "Roselle anthocyanins: Antioxidant properties and stability to heat and pH." *Molecules*. 23 : 135.
- Xu, Y. Zhi, Y. Wu, Q. Du, R. and Xu, Y. 2017. *Zygosaccharomyces bailii* is a potential producer of various flavor compounds in chinese maotai-flavor liquor fermentation. *Frontiers in Microbiology*. 8 : 2609.
- Yamada, Y. Yukphan, P. Lan Vu, H.T. Muramatsu, Y. Ochaikul, D. Tanasupawat, S. and Nakagawa, Y. 2012. "Description of *Komagataeibacter* gen. nov., with proposals of new combinations (*Acetobacteraceae*)." *Journal of General and Applied Microbiology*. 58(5) : 397–404.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Zhang, C. Chen, X. Zhang, J. Kilmartin, P.A. and Quek, S.Y. 2020. "Exploring the effects of microencapsulation on odour retention of fermented noni juice." *Journal of Food Engineering*. 273: 109892.
- Zhang, H. Qi, R.L. and Mine, Y. 2019. "The impact of oolong and black tea polyphenols on human health." *Food Bioscience*. 29 : 55-61.
- Zhang, Y. Zhang, R. Yin, H. Bai, X. Chang, Y. Xig, M. and Wang, M. (2017). "Acetobacter pasteurianus metabolic change induced by initial acetic acid to adapt to acetic acid fermentation condition." *Apply Microbial Biotechnology*. 101 : 7007-7016.
- Zhao, C.N. Tang, G.Y. Cao, S.Y. Xu, X.Y. Gan, R.Y. Liu, Q. Mao, Q.Q. Shang, A. and Li, H.B. (2019). "Phenolic profiles and antioxidant activities of 30 tea infusions from green, black, oolong, white, yellow and dark teas." *Antioxidants*. 8 : 215.
- Zhao, Z.J. Sui, Y.C. Wu, H.W. Zhou, C.B. Hu, X.C. and Jian Zhang, J. 2018. "Flavour chemical dynamics during fermentation of kombucha tea." *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 30(9) : 732-741.
- Zheng, Y. Chang, Y. Xie, S. Song J. and Wang M. 2018. "Impacts of bioprocess engineering on product formation by *Acetobacter pasteurianus*." *Applied Microbiology and Biotechnology*. 102 : 2535-2541.



## ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ก

### การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

#### 1. อาหาร DRBC (Dichloran Rose Bengal Chloramphenical agar)

ส่วนประกอบ

อาหารสูตรสำเร็จ DRBC	31.6	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ด้วยหม้อนึ่งอัดแรงดัน

#### 2. อาหาร Glucose Yeast extract Calcium carbonate Agar (GYC agar)

ส่วนประกอบ

กลูโคส	50	กรัม
ยีสต์สกัด	10	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต	20	กรัม
ผงวุ้น	10	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ด้วยหม้อนึ่งอัดแรงดัน

#### 3. สารละลายเปปโติน (Peptone) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

นำเปปโติน 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ด้วยหม้อนึ่งอัดแรงดัน

#### 4. อาหาร Plate Count Agar (PCA)

ส่วนประกอบ

อาหารสูตรสำเร็จ PCA	23.5	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ด้วยหม้อนึ่งอัดแรงดัน

#### 5. อาหาร Yeast Extract Peptone Dextrose Agar (YPD agar)

ส่วนประกอบ

ยีสต์สกัด	10	กรัม
-----------	----	------

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปป्टอน	20	กรัม
กลูโคส	20	กรัม
วุ้นผง	15	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ด้วยหม้อนึ่งอัดแรงดัน

#### 6. อาหาร Yeast Extract Peptone Dextrose Broth (YPD broth)

ส่วนประกอบ

ยีสต์สกัด	10	กรัม
เปป्टอน	20	กรัม
กลูโคส	20	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ด้วยหม้อนึ่งอัดแรงดัน

## ภาคผนวก ข

### การวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

1. การวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรีย *Acetobacter pasteurianus* AJ605

#### 1.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

เตรียมอาหาร Glucose Yeast Calcium carbonate agar (GYC agar) ตามสูตรจากภาคผนวก ก ข้อ 2. เทอาหารลงในจานอาหารปลอดเชื้อ เพื่อใช้สำหรับวิเคราะห์ต่อไป

#### 1.2 การวิเคราะห์ตัวอย่าง

1) นำตัวอย่างที่ต้องการทดสอบเจือจางแบบ 10-fold dilution ด้วยสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ระดับความเจือจาง  $10^1 - 10^6$

2) ปิเปตสารละลายเจือจางในแต่ละระดับความเข้มข้นปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนผิวหน้าอาหาร GYC agar

3) ทำการ spread plate โดยใช้แท่งแก้วรูปตัวแอลที่ผ่านการฆ่าเชื้อเกลี่ยสารละลายเจือจางให้ทั่วผิวหน้าอาหาร นำจานอาหารไปบ่มที่อุณหภูมิ  $30 \pm 2$  เป็นเวลา 3 วัน

4) นับจำนวนจุลินทรีย์ที่เจริญบนผิวหน้าอาหาร และเกิดบริเวณใส (Clear zone) รอบโคโลนี คำนวณและรายงานในหน่วย Log CFU/mL

2. การวิเคราะห์จำนวนยีสต์ทั้งหมด และวิเคราะห์จำนวนยีสต์ *Zygosaccharomyces bailii* YN403

#### 2.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

##### การวิเคราะห์จำนวนยีสต์ทั้งหมด

เตรียมอาหารสูตรสำเร็จ DRBC ตามวิธีการในภาคผนวก ก ข้อ 1. เทอาหารใส่จานอาหารปลอดเชื้อ เพื่อใช้สำหรับการวิเคราะห์ต่อไป

##### การวิเคราะห์จำนวนยีสต์ *Zygosaccharomyces bailii* YN403

เตรียมอาหาร YPD agar ตามสูตรจากภาคผนวก ก ข้อ 6. เทอาหารใส่จานอาหารปลอดเชื้อ เพื่อใช้สำหรับการวิเคราะห์ต่อไป

#### 2.2 การวิเคราะห์ตัวอย่าง

1) นำตัวอย่างที่ต้องการทดสอบเจือจางแบบ 10-fold dilution ด้วยสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ระดับความเจือจาง  $10^1 - 10^6$

2) ปิเปตสารละลายเจือจางในแต่ละระดับความเข้มข้นปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนผิวหน้าอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3) ทำการ spread plate โดยใช้แท่งแก้วรูปตัวแอลที่ผ่านการฆ่าเชื้อเกลี่ยสารละลายเชื้อจางให้ทั่วผิวน้ำอาหาร นำจานอาหารไปบ่มที่อุณหภูมิ  $30 \pm 2$  เป็นเวลา 5 วัน
- 4) นับจำนวนจุลินทรีย์ที่เจริญบนผิวน้ำอาหาร คำนวณและรายงานในหน่วย Log CFU/mL

### 3. การวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total plate count)

#### 3.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

เตรียมอาหารสูตรสำเร็จ PCA ตามวิธีการในภาคผนวก ก ข้อ 5. เทอาหารใส่จานอาหารปลอดเชื้อ เพื่อใช้สำหรับการวิเคราะห์ต่อไป

#### 3.2 การวิเคราะห์ตัวอย่าง

- 1) นำตัวอย่างที่ต้องการทดสอบเชื้อจางแบบ 10-fold dilution ด้วยสารละลายเปปโตเนอความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ระดับความเจือจาง  $10^1 - 10^6$
- 2) ปิเปิดสารละลายเชื้อจางในแต่ละระดับความเข้มข้นปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนผิวน้ำอาหาร
- 3) ทำการ spread plate โดยใช้แท่งแก้วรูปตัวแอลที่ผ่านการฆ่าเชื้อเกลี่ยสารละลายเชื้อจางให้ทั่วผิวน้ำอาหาร นำจานอาหารไปบ่มที่อุณหภูมิ  $30 \pm 2$  เป็นเวลา 5 วัน
- 4) นับจำนวนจุลินทรีย์ที่เจริญบนผิวน้ำอาหาร คำนวณและรายงานในหน่วย Log CFU/mL

### 4. การวิเคราะห์จำนวนเชื้อ *E.coli* และ Coliform (AOAC 991.14)

จำนวนเชื้อ *E.coli* และ Coliform วิเคราะห์โดยใช้แผ่นอาหารสำเร็จรูป Petrifilm™ ยี่ห้อ 3M รุ่น EC

#### 4.1 วิธีการวิเคราะห์ตัวอย่าง

- 1) เปิดแผ่นพลาสติกที่ปิดหน้าอาหารขึ้น ปิเปิดตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ 0.1 มิลลิลิตรลงบนแผ่นอาหาร
- 2) ปิดแผ่นพลาสติกลง ใช้แท่งพลาสติกกลมกดที่สารละลายเพื่อให้ตัวอย่างกระจายทั่วผิวน้ำอาหาร
- 3) บ่มแผ่นอาหารสำเร็จรูปที่อุณหภูมิ  $30 \pm 2$  เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ตรวจนับโคโลนีที่เจริญบนผิวน้ำอาหาร รายงานในหน่วย CFU/mL

## ภาคผนวก ค

### การวิเคราะห์ทางเคมี

#### 1. การวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปอะซิดิก

##### 1.1 สารเคมี

- 1) สารฟีนอล์ฟทาลีน (Phenolphthalein)
- 2) สารโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide : NaOH)
- 3) สารโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลต (KHP)

##### 1.2 การเตรียมสารเคมี

1) เตรียมสารละลายฟีนอล์ฟทาลีน ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ทำการชั่งสาร ฟีนอล์ฟทาลีน 1 กรัม ละลายด้วยแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ร้อยละ 99.5 ปรับปริมาตรด้วยขวดปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร เขย่าให้ผลึกสารฟีนอล์ฟทาลีนละลายจนหมด เก็บรักษาในภาชนะที่บดแสง

2) เตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 โมลาร์ ชั่งสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรด้วยขวดปรับปริมาตรจนครบ 1000 มิลลิลิตร

3) เตรียมสารละลายโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลต โดยชั่งสาร 0.100 – 0.150 กรัม (บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน) ใส่ฟลาสก์ ละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน 25 มิลลิลิตร

##### 1.3 การหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

1) หยดฟีนอล์ฟทาลีน 2-3 หยดลงในสารละลายโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลตที่เตรียมไว้ ไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์จนถึงจุดยุติ สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อน บันทึกปริมาตรของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้

2) คำนวณหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์จากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ (N)} = \frac{W_{\text{KHP}}}{M.W._{\text{KHP}} \times V_{\text{NaOH}}} \times 1000$$

โดย  $W_{\text{KHP}}$  = น้ำหนักที่แน่นอนของสารโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลต (กรัม)

$V_{\text{NaOH}}$  = ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ (มิลลิลิตร)

$M.W._{\text{KHP}}$  = มวลโมเลกุลของสารโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลต เท่ากับ 204.23 (กรัมต่อโมล)

#### 2. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar) โดยวิธีฟีนอล-ซัลฟิวริก

##### 2.1 สารเคมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 1) สารฟีนอล
- 2) กรดซัลฟิวริกเข้มข้น

## 2.2 การเตรียมสารเคมี

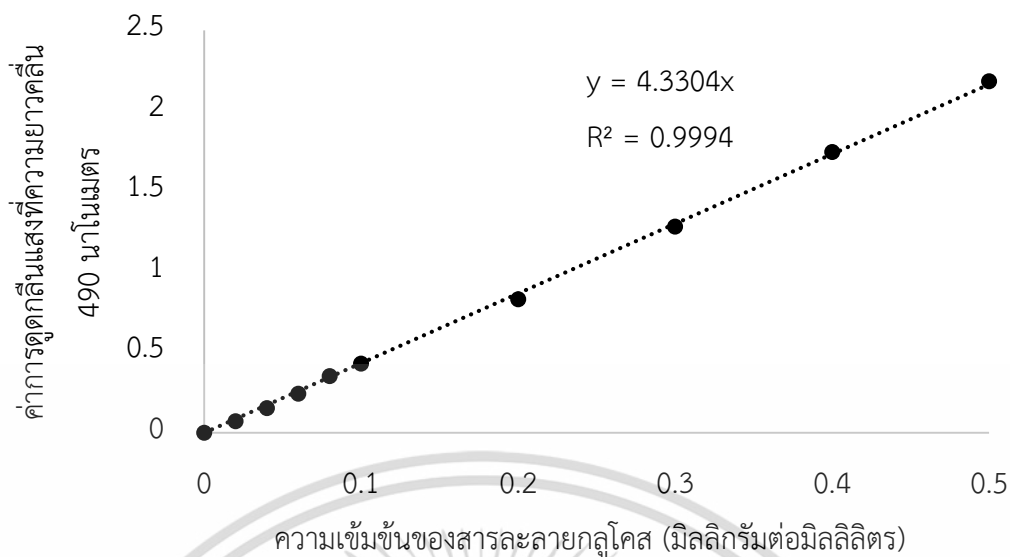
- 1) เตรียมสารละลายฟีนอล ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ทำการชั่งสารฟีนอล 5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาณจวบครบ 100 มิลลิลิตรด้วยขวดปรับปริมาตร
- 2) นำสารกลูโคสสอบไล่ความเข้มข้นที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ด้วยตู้อบลมร้อนนาน 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำออกมาไว้ให้เย็นในเตชิกเคเตอร์
- 3) ชั่งสารกลูโคสจากข้อ 1) น้ำหนัก 0.10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร จะได้ความเข้มข้นสารละลายกลูโคสเริ่มต้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

## 2.3 การทำกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

- 1) เจือจางสารละลายกลูโคสเป็นความเข้มข้น 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
- 2) ปิเปตสารละลายเจือจางกลูโคสในความเข้มข้นต่างๆ และน้ำกลั่นเป็นค่าแบลนด์ ปริมาณ 1 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายฟีนอล ความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาณ 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
- 3) ทำการเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร โดยปล่อยลงที่ผิวหน้าของสารผสมในหลอดทดลองโดยตรง ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที
- 4) เขย่าสารในหลอดทดลองด้วยเครื่อง Vortex mixer ตั้งทิ้งไว้จนครบ 30 นาที
- 5) วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Microplate reader โดยปิเปตสารตัวอย่างในหลอดทดลองปริมาณ 150 ไมโครลิตร ลงใน 96 well-plate วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร นำค่าที่วัดได้สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (x) กับค่าการดูดกลืนแสง (y) แสดงดังรูปที่ ค-1

## 2.4 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในตัวอย่าง (Total sugar)

- 1) เจือจางตัวอย่างด้วยน้ำกลั่น
  - 2) ปิเปตตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ทำการเติมสาร และวิเคราะห์เช่นเดียวกับการทำกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสในข้อ 1.2
  - 3) นำค่าที่วัดได้คำนวณปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในตัวอย่าง โดยแทนค่าลงในสมการจากกราฟมาตรฐานกลูโคส (รูปที่ ค-1)
- $$\text{ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร} \times \text{ความเจือจาง}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐานกลูโคส}}$$



รูปที่ ค-1 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

### 3. การวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ โดยใช้เครื่อง Gas-Chromatography (GC)

#### 3.1 สารเคมี

- 1) สารละลายโพรพานอล
- 2) สารเอทานอลบริสุทธิ์ ความเข้มข้นร้อยละ 99.5 โดยปริมาตร

#### 3.2 การเตรียมสารเคมี

1) เตรียมสารละลายโพรพานอลความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร ทำการปิเปตสารโพรพานอล 10 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตร เติมน้ำกลั่นและปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร

2) เตรียมสารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 0.2, 0.4, 0.8, 1.0, 2.0 และ 3.0 โดยปริมาตร

#### 3.3 การทำกราฟมาตรฐานเอทานอล

1) ปิเปตสารละลายเอทานอลความเข้มข้นต่างๆ 500 ไมโครลิตร ลงในขวดเก็บสารละลาย (Vial) ขนาด 2 มิลลิลิตร สำหรับวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์

2) เติมสารละลายโพรพานอลความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงผสมกับสารละลายเอทานอล ปิดฝาขวดทันที เขย่าสารให้เข้ากัน

3) วิเคราะห์ปริมาณเอทานอลด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (GC) ในสถานะดังนี้

- เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี : ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น GC-2014

- คอลัมน์ : ชนิด capillary รุ่น DB-1 ยี่ห้อ Agilent J&W ขนาดยาว 30 เมตร ×

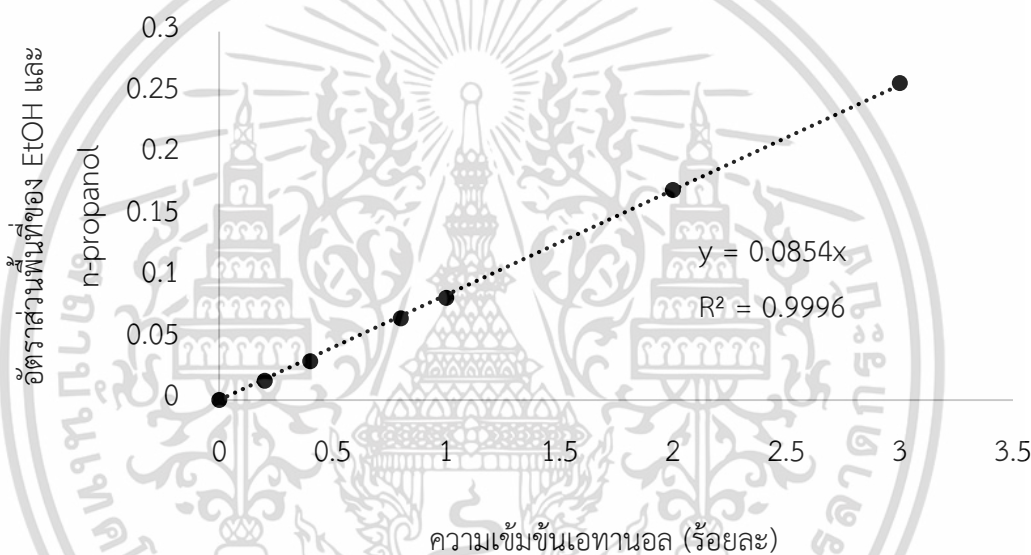
เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.32 มิลลิเมตร สารเคลือบคอลัมน์หนา 5.00 ไมโครเมตร

- Carrier gas : แก๊สฮีเลียม (Helium)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Flow control Mode : Linear velocity
- Detector : ชนิด Flame ionize (FID) อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส
- Injection mode : Split ที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส
- ปริมาณสารที่ฉีด : 0.5 ไมโครลิตร
- การตั้งค่าโปรแกรมการวิเคราะห์ : เริ่มต้น 60 องศาเซลเซียสนาน 6 นาที และเพิ่มเป็น 130 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 20 องศาเซลเซียสต่อนาที นาน 1.5 นาที

4) นำค่าที่ได้คำนวณอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายโพรพานอล และสารละลายเอทานอล เขียนกราฟความสัมพันธ์ของร้อยละความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลมาตรฐาน (x) และอัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟ (y) แสดงดังรูปที่ ค-2



รูปที่ ค-2 กราฟมาตรฐานสารละลายเอทานอล

#### 4. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total Phenolic content)

##### 4.1 สารเคมี

- 1) สารโพลินซีโอคาลทิว (Folin-Ciocalteu reagent)
- 2) สารโซเดียมคาร์บอเนต ( $\text{NaCO}_3$ )
- 3) กรดแกลลิก

##### 4.2 การเตรียมสารเคมี

1) เตรียมสารละลายโพลินซีโอคาลทิว ความเข้มข้นร้อยละ 7.5 โดยปริมาตร โดยปิเปตสารโพลินซีโอคาลทิว 7.5 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น และปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร

2) เตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ชั่งสารโซเดียมคาร์บอเนต 10 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรด้วยขวดปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร

3) เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งกรดแกลลิก 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรด้วยขวดปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร

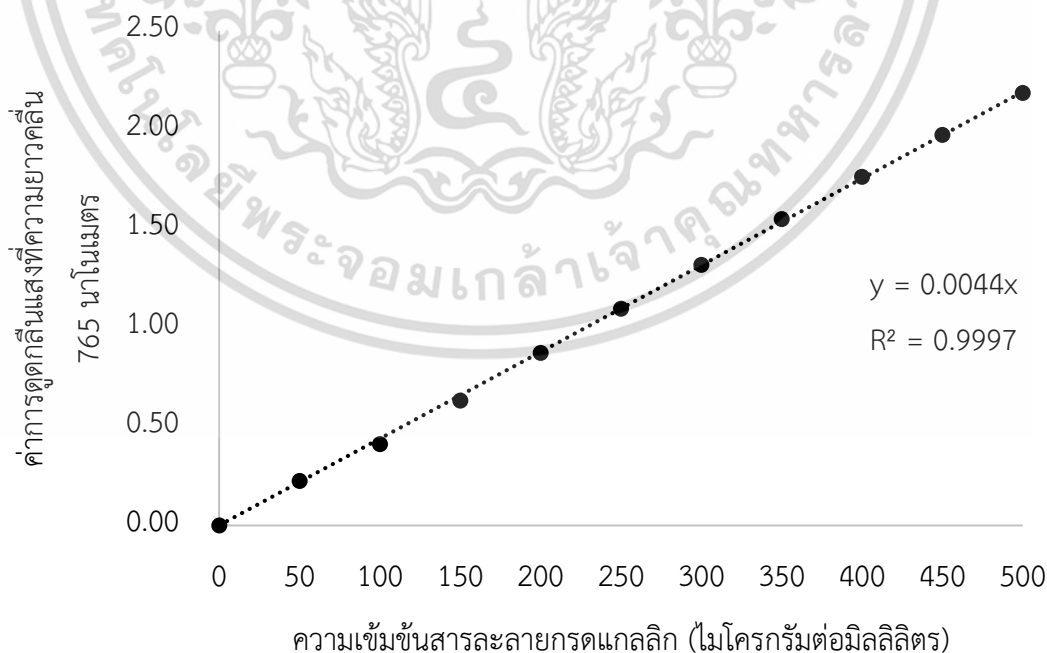
#### 4.3 การทำกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก

1) เจือจางสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกความเข้มข้น 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2) ปิเปตสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกความเข้มข้นต่างๆ 20 ไมโครลิตรลงใน 96 well-plate และใช้น้ำกลั่นเป็นค่าแบลนด์ ทำการเติมสารละลายฟอสฟอรัสวานิลเลียม ความเข้มข้นร้อยละ 7.5 โดยปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงในหลุมของสารละลายมาตรฐาน เขย่าเพลาเพื่อทำปฏิกิริยา ตั้งทิ้งไว้ 5 นาทีในที่มืด

3) เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร 80 ไมโครลิตร เขย่าเพลาแล้วตั้งทิ้งไว้ 30 นาทีในที่มืดเพื่อทำปฏิกิริยา

4) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader นำค่าที่ได้สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (x) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร (y) แสดงดังรูปที่ ค-3



รูปที่ ค-3 กราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 5. การวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total flavonoid content)

### 5.1 สารเคมี

- 1) สารโซเดียมไนไตรท์ ( $\text{NaNO}_2$ )
- 2) สารอะลูมิเนียมไตรคลอไรด์ ( $\text{AlCl}_3$ )
- 3) สารโซเดียมไฮดรอกไซด์ ( $\text{NaOH}$ )
- 4) สารเคอควิทิน (Quercetin)
- 5) เมทานอล

### 5.2 การเตรียมสารเคมี

1) เตรียมสารละลายโซเดียมไนไตรท์ความเข้มข้นร้อยละ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยทำการชั่งสารโซเดียมไนไตรท์ 3 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตรด้วยขวดปรับปริมาตร

2) เตรียมสารละลายอะลูมิเนียมไตรคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ทำการชั่งสารอะลูมิเนียมไตรคลอไรด์ 3 กรัม ละลายสารในน้ำกลั่น ทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตรด้วยขวดปรับปริมาตร

3) เตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 โมล โดยทำการชั่งสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร แล้วจึงทำการปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร

### 5.3 การทำกราฟมาตรฐานสารเคอควิทิน

1) เตรียมสารละลายเคอควิทินความเข้มข้น  $1 \times 10^4$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งสารเคอควิทิน 0.1 กรัม ละลายในเมทานอล ปรับปริมาตรจนครบ 10 มิลลิลิตร ทำการเจือจางสารละลายเป็นความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 0, 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800 และ 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

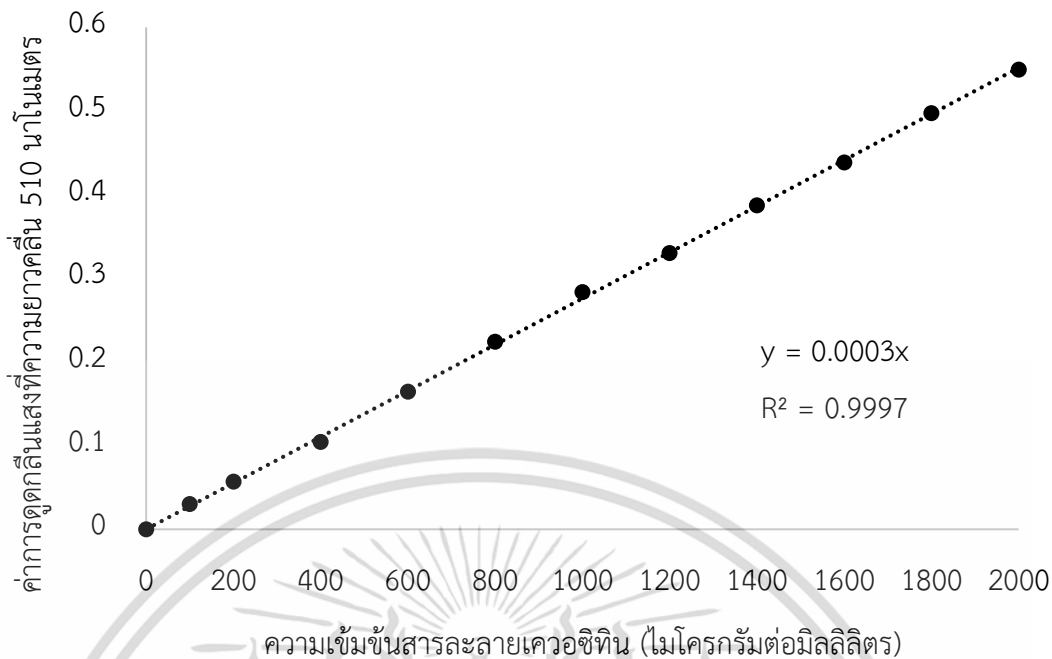
2) ปิเปตสารละลายเคอควิทิน 100 ไมโครลิตรลงในหลอดไมโครทิวป์ เติมน้ำกลั่น 400 ไมโครลิตร ทำการเติมสารละลายโซเดียมไนไตรท์ความเข้มข้นร้อยละ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร 30 ไมโครลิตร เขย่าสารให้เข้ากัน ป้มสาร 5 นาที

3) ทำการเติมสารละลายอะลูมิเนียมไตรคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร 30 ไมโครลิตร เขย่าสารให้เข้ากันและบ่มนาน 6 นาที

4) เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมล ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่น 240 ไมโครลิตร เขย่าสารให้เข้ากัน

5) ทำการปิเปตสารละลายที่ทำปฏิกิริยาแล้วใส่ลงใน 96 well-plate ปริมาตร 200 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตรด้วยเครื่อง Microplate reader นำค่าที่ได้สร้างความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายเคอควิทิน (x) และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร (y)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ค-4 กราฟมาตรฐานสารละลายควอซีทิน

## 6. การวิเคราะห์ปริมาณสารแอนโทไซยานินทั้งหมด (Total anthocyanin content)

### 6.1 สารเคมี

1) โซเดียมอะซิเตต ไตรไฮเดรต (Sodium acetate trihydrate;  
 $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ )

2) กรดอะซิติก (Gracial acetic acid)

3) โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)

4) กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (HCl)

### 6.2 การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์

1) สารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตตความเข้มข้น 0.4 โมล ความเป็นกรดเบส 4.5 ปริมาณสารโซเดียมอะซิเตต ไตรไฮเดรต (มวลโมเลกุล 136.08 กรัมต่อโมล) แทนค่าในสูตร

$$g = \frac{(136.08 \times 0.4 \times 500)}{1000}$$

$$= 27.22 \text{ กรัม}$$

ซึ่งสารโซเดียมอะซิเตต 27.22 กรัม ละลายสารในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ครบ 500 มิลลิลิตร นำไปปรับค่าความเป็นกรดเบสด้วยกรดอะซิติก จนได้ค่ากรดเบสเท่ากับ 4.5

2) สารละลายบัฟเฟอร์โพแทสเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.025 โมล ความเป็นกรดเบส 1.0 (มวลโมเลกุล 74.55 กรัมต่อโมล) แทนค่าในสูตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$g = \frac{(74.55 \times 0.025 \times 500)}{1000}$$

$$= 0.93 \text{ กรัม}$$

ชั่งสารโพแทสเซียมคลอไรด์ 0.93 กรัม ละลายสารในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ครบ 500 มิลลิลิตร นำไปปรับค่าความเป็นกรดเบสด้วยสารไฮโดรคลอริก (HCL) เข้มข้น จนได้ค่ากรดเบสเท่ากับ 1.0

## 7. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging

### 7.1 สารเคมี

- 1) 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)
- 2) กรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid)
- 3) สารเอทานอลบริสุทธิ์ ความเข้มข้นร้อยละ 99.5 โดยปริมาตร

### 7.2 การเตรียมสารเคมี

1) เตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ (มวลโมเลกุล 394.32 กรัมต่อโมล) แทนค่าในสูตร

$$g = \frac{394.32 \times 0.2 \times 100}{1000}$$

$$= 7.886 \text{ มิลลิกรัม}$$

ชั่งสาร DPPH 7.886 มิลลิกรัม ละลายในแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ร้อยละ 99.5 ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร เก็บในภาชนะที่บดแสง

2) เตรียมสารละลายกรดแอสคอร์บิกความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ชั่งกรดแอสคอร์บิก 10.0 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตรด้วยขวดปรับปริมาตร

### 7.3 การทำกราฟมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก

1) เจือจางสารละลายกรดแอสคอร์บิกเป็นความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 0.1, 0.09, 0.08, 0.07, 0.06, 0.05, 0.04, 0.03, 0.02 และ 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2) ปิเปตสารละลายกรดแอสคอร์บิกความเข้มข้นต่างๆ 50 ไมโครลิตรลงใน 96 well-plate และปิเปตเอทานอลบริสุทธิ์เป็นค่าแบลนด์ เติมสารละลายอนุมูลอิสระ DPPH 150 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที

3) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader คำนวณกิจกรรมในการยับยั้งอนุมูลอิสระของกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้สมการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

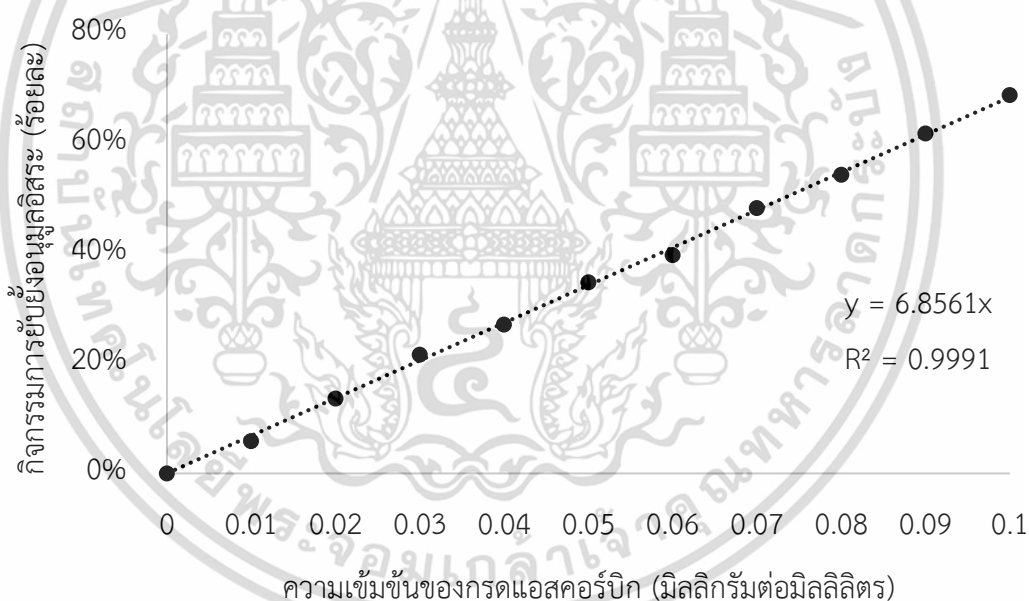
กิจกรรมในการยับยั้งอนุมูลอิสระของกรดแอสคอร์บิก (ร้อยละ)

$$= \frac{\Delta A_{\text{control}} - \Delta A_{\text{sample}}}{\Delta A_{\text{control}}} \times 100$$

โดย  $\Delta A_{\text{control}}$  = ผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายอนุมูลอิสระ DPPH กับค่าการดูดกลืนแสงของเอทานอล คำนวณจาก  $A_{\text{control}} - \text{Blank}_{\text{control}}$

$\Delta A_{\text{sample}}$  = ผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงของกรดแอสคอร์บิกเจือจางที่ถูกกระตุ้นด้วยสารละลาย DPPH กับค่าการดูดกลืนแสงของกรดแอสคอร์บิกเจือจางผสมกับเอทานอล คำนวณจาก  $A_{\text{sample}} - \text{Blank}_{\text{sample}}$

นำค่าที่คำนวณได้สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิก (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) (x) กับกิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ (ร้อยละ) (y) สร้างสมการความสัมพันธ์เพื่อหาค่าความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิก (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้ร้อยละ 50 ( $y = 50\%$ ) (Inhibitory concentration at 50% : IC<sub>50</sub>)



รูปที่ ค-5 กราฟมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก

จากสมการความสัมพันธ์	$y = 6.8561x$
แทนค่า $y = 50$ จะได้	$x = 50 / 6.8561$
	$x = 0.073$

ดังนั้น ความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิก 0.073 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีกิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระร้อยละ 50 (IC<sub>50</sub> Ascorbic acid = 0.073)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 8. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS radical scavenging

### 8.1 สารเคมี

1) 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS)

2) สารโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต

3) สารโทรลอคซ์ (Trolox)

### 8.2 การเตรียมสารเคมี

1) เตรียมสารละลายอนุมูลอิสระ ABTS ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ (มวลโมเลกุล 514.62 กรัมต่อโมล) คำนวณจากสูตร

$$\frac{g}{MW.} = \frac{CV}{1000} \dots\dots(1)$$

โดย g = น้ำหนักของสารที่ต้องชั่ง (กรัม)

MW. = มวลโมเลกุล (กรัมต่อโมล)

C = ความเข้มข้นของสารที่ต้องการเตรียม (โมลต่อลิตร)

V = ปริมาตรสารที่ต้องการเตรียม

แทนค่าในสูตร

$$g = \frac{514.62 \times 7 \times 10}{1000}$$

$$= 36.02 \text{ มิลลิกรัม}$$

ชั่งสาร ABTS 36.02 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรด้วยขวดปรับปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร

2) เตรียมสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต (มวลโมเลกุล 270.322 กรัมต่อโมล) ความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์ แทนค่าในสูตร (1)

$$g = \frac{270.322 \times 2.45 \times 10}{1000}$$

$$= 6.623 \text{ มิลลิกรัม}$$

ชั่งสารโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต 6.623 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรด้วยขวดปรับปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย ABTS จากข้อ 1) และสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต จากข้อ 2) ในอัตราส่วน 1:1 เก็บไว้ในที่มืดเพื่อทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 16 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดเป็นสาร  $ABTS^{\cdot+}$  เจือจางสาร  $ABTS^{\cdot+}$  ให้ได้ค่าดูดกลืนแสง (Absorbance)  $0.7 \pm 0.02$  ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร

3) เตรียมสารละลายโทรลอคซ์ ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทำการชั่งสารโทรลอคซ์ 10.0 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรด้วยขวดปรับปริมาตรจนครบ 10 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 8.3 การทำกราฟมาตรฐานสารโทรลอกซ์

1) เจือจางสารละลายโทรลอกซ์เป็นความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 0.03, 0.025, 0.02, 0.015, 0.01 และ 0.005 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2) ปิเปตสารละลายโทรลอกซ์ความเข้มข้นต่างๆ 50 ไมโครลิตร และปิเปตน้ำกลั่นเป็นค่าแบลงค์ เติมสารละลายอนุมูลอิสระ ABTS ที่เจือจางแล้ว 150 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที

3) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader คำนวณกิจกรรมในการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารละลายโทรลอกซ์ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้

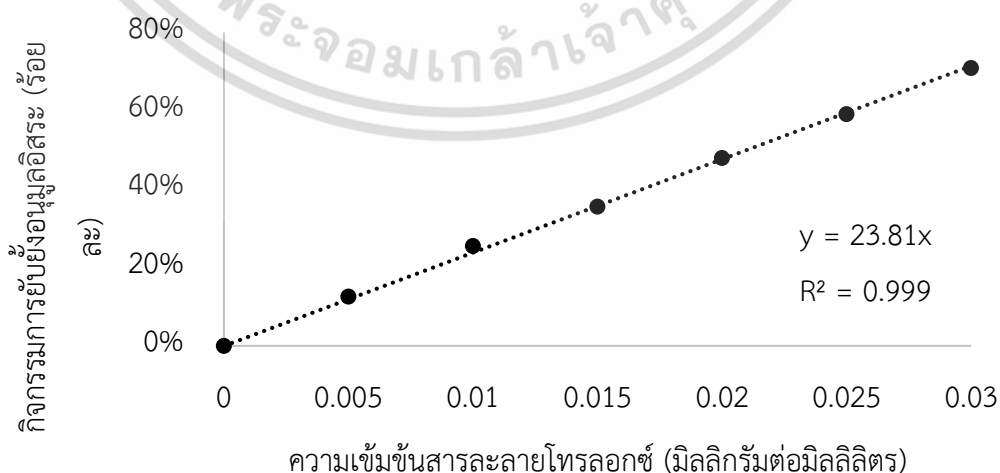
กิจกรรมในการยับยั้งอนุมูลอิสระของสารละลายโทรลอกซ์ (ร้อยละ)

$$= \frac{\Delta A_{\text{control}} - \Delta A_{\text{sample}}}{\Delta A_{\text{control}}} \times 100$$

โดย  $\Delta A_{\text{control}}$  = ผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายอนุมูลอิสระ ABTS กับค่าการดูดกลืนแสงของน้ำกลั่น คำนวณจาก  $A_{\text{control}} - \text{Blank}_{\text{control}}$

$\Delta A_{\text{sample}}$  = ผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโทรลอกซ์เจือจางที่ถูกกระตุ้นด้วยสารละลาย ABTS กับค่าการดูดกลืนแสงของสารโทรลอกซ์เจือจางผสมกับน้ำกลั่น คำนวณจาก  $A_{\text{sample}} - \text{Blank}_{\text{sample}}$

นำค่าที่คำนวณได้สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายโทรลอกซ์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) (x) กับกิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ (ร้อยละ) (y) สร้างสมการความสัมพันธ์เพื่อหาค่าความเข้มข้นของสารละลายโทรลอกซ์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ได้ร้อยละ 50 ( $y = 50\%$ ) (Inhibitory concentration at 50% : IC50)



รูปที่ ๓-6 กราฟมาตรฐานสารโทรลอกซ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$\begin{aligned} \text{จากสมการความสัมพันธ์} & \quad y = 23.81x \\ \text{แทนค่า } y = 0.5 \text{ จะได้} & \quad x = 0.5 / 23.81 \\ & \quad x = 0.021 \end{aligned}$$

ดังนั้น ความเข้มข้นของสารโทรลอกซ์ 0.021 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีกิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระร้อยละ 50 ( $IC_{50}$  Ascorbic acid = 0.073)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



## ประวัติผู้เขียน

- ชื่อ นางสาว ธัญญรัตน์ สุทธิพัฒนกุล
- วัน เดือน ปีเกิด 23 กันยายน 2534
- ที่อยู่ปัจจุบัน 84 หมู่ 12 ต.กลางดง อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา 30320
- ประวัติการศึกษา (2556) วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม เกรดเฉลี่ย 3.05  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- ผลงานทางวิชาการ Sutthiphatkul, T. Mangmool, S. Rungjindamai, N. and Ochaikul, D. 2023. “Characteristics and antioxidant activities of kombuha from black tea and roselle by mixed starter culture.” *Current Applied Science and Technology*. 23(4) : 1-15.
- งานสัมมนาทางวิชาการ Sutthiphatkul, T., Mangmool, S. Rungjindamai, N. and Ochaikul, D. 2022. “Characteristics and antioxidant activities of kombuha from black tea and roselle by a mixed starter culture.” In conference of The 18<sup>th</sup> International Symposium on Biocontrol and Biotechnology (ISBB2022). Bangkok: Online. 16-17 June 2022.
- ผลงานทางวิชาการอื่นๆ SUTTHIPHATKUL, T. SUWANPOSRI, A. and OCHAIKUL, D. 2020. “Optimization of bacterial cellulose production from wastewater of noodle processing by *Komagataeibacter* sp. PAP1 and bio-cellulose paper production.” *Walailak Journal of Science and Technology*. 17(11) : 1241-51.
- Thongluedee, R. Vatanavicharn, T. Sutthiphatkul, T and Ochaikul, D. 2022. “Production of herbal vinegar using isolated microorganisms from traditional herbal vinegar fermentation.” *Current Applied Science and Technology*. 23(2) : 1-10.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้