การคัดแยกและจัดจำแนกเชื้อยีสต์และแบคทีเรียอะซิติก จากหัวเชื้อคอมบูชาเพื่อผลิตเครื่องดื่มคอมบูชา

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF YEASTS AND ACETIC ACID BACTERIA FROM CONSORTIUM OF KOMBUCHA TEA FOR KOMBUCHA BEVERAGE PRODUCTION

ปิยวรรณ วัชรอาภาไพบูลย์
PIYAWAN WATCHARAAPAPIBOON

หัวข้อวิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ 2563
KMITL – 2020-SC-M-020-032

การคัดแยกและจัดจำแนกเชื้อยีสต์และแบคทีเรียอะซิติก จากหัวเชื้อคอมบูชาเพื่อผลิตเครื่องดื่มคอมบูชา

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF YEASTS AND ACETIC ACID BACTERIA FROM CONSORTIUM OF KOMBUCHA TEA FOR KOMBUCHA BEVERAGE PRODUCTION

ปิยวรรณ วัชรอาภาไพบูลย์
PIYAWAN WATCHARAAPAPIBOON

หัวข้อวิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ 2563
KMITL – 2020-SC-M-020-032

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF YEASTS AND ACETIC ACID BACTERIA FROM CONSORTIUM OF KOMBUCHA TEA FOR KOMBUCHA BEVERAGE PRODUCTION

PIYAWAN WATCHARAAPAPIBOON

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE
REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF MASTER IN BIOTECHNOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGY , FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
YEAR 2020
KMITL -2020-SC-M-020-032

COPPYRIGHT 2020
FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การคัดแยกและจัดจำแนกเชื้อยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกจากหัวเชื้อคอมบูชาเพื่อผลิตเครื่องดื่มคอมบูชา
นักศึกษา นางสาวปิยวรรณ วัชรอาภาไพบูลย์
รหัสประจำตัว 58605103
ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา ชีววิทยา
พ.ศ. 2563
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ. ดวงใจ โอชัยกุล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์(ร่วม) ผศ. ดร. ธิปชัย วัฒนวิจารณ์

บทคัดย่อ

คอมบูชา เกิดจากการหมักชากับน้ำตาล ได้รับความนิยมในการบริโภคกันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากเป็นเครื่องดื่มที่ให้ความสดชื่น และมีประโยชน์ต่อสุขภาพของมนุษย์ เครื่องดื่มชนิดนี้เกิดจากการหมักชากับน้ำตาลด้วยจุลินทรีย์ที่ทำงานร่วมกันคือ ยีสต์ และ แบคทีเรียอะซิติก ซึ่งงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกและจัดจำแนกจุลินทรีย์ในกลุ่มยีสต์และแบคทีเรียอะซิติก เพื่อให้การหมักคอมบูชามีประสิทธิภาพมากขึ้น จากการคัดแยกยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกจากหัวเชื้อคอมบูชาทั้ง 3 แหล่ง ได้แก่ นนทบุรี กรุงเทพมหานคร และเชียงใหม่ สามารถคัดแยกยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกได้ 97 และ 99 ไอโซเลต ตามลำดับ เมื่อศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี และจัดจำแนกด้วยวิธีชีวโมเลกุล พบว่ายีสต์ *Zygosaccharomyces bailii* ไอโซเลต YN403 สามารถเจริญได้ในอาหารชาอู่หลงที่ปรับพีเอชเท่ากับ 3.0 และสามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้สูงสุดร้อยละ 4.91±0.17 โดยปริมาตร สำหรับแบคทีเรียอะซิติก พบว่า *Acetobacter pasteurianus* ไอโซเลต AJ605 สามารถผลิตกรดทั้งหมด (ร้อยละกรดอะซิติก) ได้ร้อยละ 1.18±0.03 จากนั้นนำยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกมาใช้เป็นหัวเชื้อคอมบูชาโดยใช้อัตราส่วนของเชื้อยีสต์ *Z. bailii* และ *A. pasteurianus* ที่แตกต่างกัน ดังนี้ 3:7 4:6 5:5 6:4 และ 7:3 เปรียบเทียบกับหัวเชื้อคอมบูชาทางการค้า ในการหมัก 21 วัน พบว่าคอมบูชาที่ได้มีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 2.64-2.69 ปริมาณกรดทั้งหมด (ร้อยละกรดอะซิติก) อยู่ในช่วง 1.12-1.35 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดอยู่ในช่วง 47.12-49.05 ปริมาณแอลกอฮอล์อยู่ในช่วงร้อยละ 2.25-2.80 และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH อยู่ในช่วงร้อยละ 96.48-98.51 การทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านความใส สี กลิ่น รสชาติ และความชอบโดยรวม พบว่าอัตราส่วน 6:4 มีคะแนนทางด้านรสชาติและความชอบโดยรวมในช่วง 7-10 วัน สูงกว่าอัตราส่วนอื่น แต่มีคะแนนต่ำกว่าการใช้หัวเชื้อทางการค้า

คำสำคัญ : คอมบูชา *Zygosaccharomyces bailii* *Acetobacter pasteurianus* เชื้อผสม

Thesis Title Isolation and identification of yeasts and acetic acid bacteria from consortium of kombucha tea for kombucha beverage production
Student Name Piyawan Watcharaapapaiboon
Student ID 58605103
Degree Master of Science (Biotechnology)
Department Biology
Year 2020
Thesis Advisor Assoc. Prof. Duangjai Ochaikul
Thesis Co-advisor Asst. Prof. Dr. Tipachai Vatanavicharn

Abstract

Kombucha, a fermented sugar black tea, is widely consumed due to refreshing and beneficial on human health. During fermentation process, the yeast and acetic acid bacteria are the predominant microorganisms. Thus, the aim of this research was isolated and identification of yeast and acetic acid bacteria from kombucha in three provinces of Thailand including Bangkok, Nonthaburi and Chiangmai for more effective kombucha fermentation. The results showed that 97 isolated yeast and 99 isolated acetic acid bacteria were selected, biochemical test and identified by molecular techniques. It was found that *Zygosaccharomyces bailii* YN403 were cultured in sweet Oolong tea medium (pH3) and showed the highest ethanol production of 4.91±0.17%. For acetic acid bacteria, *Acetobacter pasteurianus* AJ605 showed that exhibited the highest total acid of 1.18±0.03%. *Z. bailii* and *A. pasteurianus* were utilized to produce kombucha in difference ratio such as 3:7 4:6 5:5 6:4 and 7:3 compare to commercial kombucha. From there case, the pH values, total acidity content, total sugar, alcohol content, DPPH radical scavenging assay and sensory evaluation were 2.64-2.69, 1.12-1.35%, 47.12-49.05 g/L, 2.25-2.80% and 96.48-98%. Sensory test of clarity, colour, aroma, taste and favored, the ratio 6:4 showed highest score of taste and favored in day 7-10 than others ratio but lower than commercial kombucha tea.

Keywords : Kombucha *Zygosaccharomyces bailii* *Acetobacter pasteurianus* Mixed culture

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ด้วยความช่วยเหลือ จากบุคคลต่อไปนี้ ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดวงใจ โอชัยกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ ผู้ให้คำแนะนำแนวทางในการค้นคว้า และจัดทำวิจัย รวมทั้งตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์นี้ให้สมบูรณ์ ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ดร. อรไท สุขเจริญ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุทธิจิต ศรีวัชรกุล ที่ให้คำแนะนำด้านการทดลอง ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกเกี่ยวกับอุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีต่างๆในห้องปฏิบัติการ เจ้าหน้าที่ธุรการที่ได้อำนวยความสะดวกในการดำเนินงาน สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่และญาติพี่น้อง ที่เป็นกำลังกายและกำลังใจให้กับผู้จัดทำ จนกระทั้งก้าวมาถึงวันนี้ได้ ตลอดจนขอขอบคุณเพื่อนๆ ที่ให้ความช่วยเหลือและคอยเป็นกำลังใจให้กันเสมอมา

คุณงามความดีใดๆที่เกิดขึ้นจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ผู้วิจัยขอมอบแด่บิดา มารดา ครอบครัว และครูบาอาจารย์ที่ประสิทธิ์ประสาทความรู้ ตลอดจนกัลยานิมิตรทั้งหลาย

นางสาวปิยวรรณ วัชรอาภาไพบูลย์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญรูปภาพ	จ
สารบัญตาราง	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 คอมบูชา (Kombucha)	4
2.2 กระบวนการหมักคอมบูชา	4
2.3 จุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการผลิตคอมบูชา	6
2.3.1 ยีสต์ (Yeasts)	6
2.3.1.1 เกณฑ์ในการจัดจำแนกประเภทยีสต์	6
2.3.1.2 ยีสต์ที่พบในกระบวนการผลิตคอมบูชา	9
2.3.2 แบคทีเรียอะซิติก (Acetic acid bacteria)	9
2.3.2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียอะซิติก	10
2.3.2.2 การจัดจำแนกแบคทีเรียอะซิติก	10
2.3.2.3 แบคทีเรียอะซิติกที่พบในกระบวนการผลิตคอมบูชา	15
2.4 ชา	20
2.5 ปฏิกิริยาของคอมบูชา	21
2.6 ประโยชน์ของคอมบูชา	22
2.7 อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ	22
2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	25
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	27
3.1 วัตถุดิบ	27
3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ	27

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.3 สารเคมี 27
3.4 อุปกรณ์ 27
3.5 หัวเชื้อคอมบูชาที่ใช้ในการแยกเชื้อยีสต์ และแบคทีเรียอะซิติก 28
3.6 ขั้นตอนการดำเนินงาน 28
3.6.1 การเตรียมหัวเชื้อคอมบูชา 28
3.6.2 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณยีสต์และแบคทีเรียอะซิติก ระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชา 28
3.6.3 การแยกยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกจากคอมบูชา 29
3.6.4 การทำเชื้อจุลินทรีย์ให้บริสุทธิ์ 29
3.6.5 การศึกษาความสามารถในการผลิตเอทานอลและความสามารถทนกรดจากเชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้จากคอมบูชา 29
3.6.5.1 เตรียมหัวเชื้อยีสต์ในการหมัก 29
3.6.5.2 ทดสอบความสามารถในการผลิตเอทานอลและความสามารถในการทนกรด 30
3.6.6 ศึกษาความสามารถในการผลิตกรดทั้งหมด (ร้อยละกรดอะซิติก) จากแบคทีเรียอะซิติกที่แยกได้ 30
3.6.6.1 เตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียอะซิติกในการหมัก 30
3.6.6.2 ทดสอบความสามารถในการผลิตกรดทั้งหมด (ร้อยละกรดอะซิติก) 30
3.6.7 การจัดจำแนกยีสต์ 31
3.6.7.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ยีสต์ 31
3.6.7.2 การจัดจำแนกเชื้อยีสต์ด้วยข้อมูลทางพันธุกรรม 31
3.6.7.3 ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของยีสต์ 33
3.6.8 การจัดจำแนกแบคทีเรียอะซิติก 33
3.6.8.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียอะซิติก 33
3.6.8.2 การจัดจำแนกแบคทีเรียอะซิติกด้วยข้อมูลทางพันธุกรรม 33
3.6.8.3 ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียอะซิติก 35
3.6.9 การศึกษาอัตราส่วนผสมของยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกที่แยกได้ 36
3.6.9.1 การเตรียมหัวเชื้อยีสต์ 36
3.6.9.2 การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียอะซิติก 36

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.6.9.3 การหมักคอมบูชาโดยใช้เชื้อที่แยกได้ 36
3.6.9.4 ศึกษาคุณภาพทางเคมี และคุณภาพทางประสาทสัมผัสของคอมบูชาที่ผลิตได้ 37
3.6.11 การวิเคราะห์ทางสถิติ 38
บทที่ 4 ผลและการอภิปรายผล 39
4.1 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเชื้อยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกในระหว่างการหมักคอมบูชา 39
4.2 ผลการคัดแยกและคัดเลือกยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตเอทานอลและทนกรด 43
4.3 การคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียอะซิติกที่มีความสามารถในการผลิตกรด 44
4.4 การจัดจำแนกสายพันธุ์ของยีสต์ 45
4.5 การจัดจำแนกแบคทีเรียอะซิติก 51
4.6 ผลการศึกษาการหมักคอมบูชาด้วยอัตราส่วนผสมของยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกที่แยกได้ 54
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 69
5.1 สรุปผลการวิจัย 69
5.2 ข้อเสนอแนะ 70
เอกสารอ้างอิง 71
ภาคผนวก 77
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี 78
ภาคผนวก ข การวิเคราะห์และเครื่องมือวิเคราะห์ 82
ภาคผนวก ค แบบประเมินทางประสาทสัมผัส 86
ภาคผนวก ง การวิเคราะห์ทางสถิติ 87

สารบัญรูปภาพ

รูปที่		หน้า
2.1	กระบวนการผลิตชาหมักคอมบูชา	4
2.2	รูปร่างของยีสต์แบบต่าง ๆ	6
2.3	รูปร่างของแอสคัสและแอสโคสปอร์ (a) กลมและค่อนข้างรี; *Schizosaccharomyces pombe* (b) กลมและรูปไข่; *Saccharomyces cerevisiae* (c) กลมและรูปไข่ (d) (e) รูปไต; *Kluyveromyces marxianus*, (f) กลมและผนังเป็นรอยยักที่ผิว(g) รูปร่างเป็นหมวกทหาร (helmet-shaped) หรือรูปร่างครึ่งวงกลม (hemispherical); *Pichia membranaefaciens*, (h) รูปร่างเป็นหมวก (hat-shaped); *Saccharomycopsis fibuligera* และ (i)รูปร่างเป็นดาวเสาร์ (Saturn-shaped)และผิวเรียบ; *Williopsissaturnus*	7
2.4	แสดงลักษณะความสัมพันธ์ทางสายการวิวัฒนาการของแบคทีเรียผลิตอะซิติก ใน Family *Acetobacteraceae* โดยอาศัยพื้นฐานการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และความสัมพันธ์ ตามลำดับวิวัฒนาการบริเวณ 16S rDNA	11
2.5	กระบวนการผลิตชาเขียว ชาอู่หลง และชาดำ	21
4.1	การเปลี่ยนแปลงปริมาณยีสต์ระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชาด้วยหัวเชื้อคอมบูชาจากแหล่งต่างๆ หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน	39
4.2	การเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียอะซิติกระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชาโดยใช้หัวเชื้อคอมบูชาจากแหล่งต่างๆ หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน A: อาหาร GYC และ B: อาหาร GEM	41
4.3	ปริมาณกรดทั้งหมด(ร้อยละกรดอะซิติก) ที่ผลิตได้จากไอโซเลตแบคทีเรียอะซิติกในชาอู่หลง หมักในสภาวะนิ่ง อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสนาน 10 วัน	43
4.4	รูปร่างเซลล์ *Zygosaccharomyces bailii* YN403 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (SEM) ที่กำลังขยาย 2,500 เท่า	46
4.5	แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีสต์ในบริเวณ ITS region ด้วยวิธี Neighbor- joining ด้วยโปรแกรม MEGA6	50
4.6	รูปร่างเซลล์ของ *Acetobacter pasteurianus* AC605 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (SEM) ที่กำลังขยาย 10,000 เท่า	51

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

4.7 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแบคทีเรียอะซิติกที่คัดแยกได้ ด้วยวิธี Neighbor- joinong ด้วยโปรแกรม MEGA6 53
4.8 การเปลี่ยนแปลงพีเอชและปริมาณกรดทั้งหมด (ร้อยละกรดอะซิติก) ระหว่างการหมักคอมบูชาด้วยยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกในอัตราส่วนต่างๆ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 21 วัน 57
4.9 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของคอมบูชาหมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์ของยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน หมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 21 วัน 58
4.10 การเปลี่ยนแปลงปริมาณของแข็งที่ละลายทั้งหมดของคอมบูชาหมักด้วยเชื้อยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน หมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 21 วัน 60
4.11 ปริมาณแอลกอฮอล์ระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชาด้วยเชื้อของยีสต์และแบคทีเรียอะซิติก 61
4.12 การเปลี่ยนแปลงฤทธิ์ในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของคอมบูชาหมักด้วยเชื้อยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน หมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 21 วัน 63
4.12 การเปลี่ยนแปลงฤทธิ์ในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของคอมบูชาหมักด้วยเชื้อยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน หมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 21 วัน 63
4.13 การทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านความใสของคอมบูชาหมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์ของยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกที่แยกได้ในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน หมักที่อุณหภูมิห้อง 64
4.14 การทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านสีของคอมบูชาหมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์ของยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกที่แยกได้ในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน หมักที่อุณหภูมิห้อง 65
4.15 การทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นของคอมบูชาหมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์ของยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกที่แยกได้ในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน หมักที่อุณหภูมิห้อง 67
4.16 การทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านรสชาติของคอมบูชาหมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์ของยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกที่แยกได้ในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน หมักที่อุณหภูมิห้อง 68
4.17 การทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านความชอบโดยรวมของคอมบูชาหมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์ของยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกที่แยกได้ในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน หมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 21 วัน 70
ข-1 กราฟมาตรฐานเอทานอล 82
ข-2 กราฟมาตรฐานสารละลายน้ำตาลกลูโคส 84

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ลักษณะที่แตกต่างกันของสกุล Acetobacter, Gluconobacter, Acidomonas, Gluconacetobacter และ Asaia	16
2.2 ลักษณะที่แตกต่างของสกุล Kozakia, Swaminathania, Saccharibacter, Neoasaia และ Granulibacter	18
3.1 แสดงสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ	31
3.2 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ใช้ในการตรวจสอบ Recombination Plasmid	33
3.3 แสดงสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแบคทีเรียอะซิติกที่แยกได้	34
3.4 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ใช้ในการตรวจสอบ Recombination plasmid	35
4.1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณของยีสต์ระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชาด้วยหัวเชื้อคอมบูชาจากแหล่งต่างๆ หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน	40
4.2 การเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียอะซิติกระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชา โดยใช้หัวเชื้อคอมบูชาจากแหล่งต่างๆ หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน	40
4.3 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดทั้งหมด (ร้อยละกรดอะซิติก) ระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชาด้วยหัวเชื้อคอมบูชาจากแหล่งต่างๆ หมักที่อุณหภูมิห้องนาน 10 วัน	42
4.4 การเปลี่ยนแปลงของพีเอชระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชาด้วยหัวเชื้อคอมบูชาจากแหล่งต่างๆ หมักที่อุณหภูมิห้องนาน 10 วัน	42
4.5 ปริมาณแอลกอฮอล์และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรของไอโซเลตยีสต์หมักในชาอู่หลงที่มีพีเอช 3.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน	44
4.6 ปริมาณกรดทั้งหมด(ร้อยละกรดอะซิติก) ที่ผลิตได้จากไอโซเลตแบคทีเรียอะซิติกในชาอู่หลง หมักในสภาวะนิ่ง อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสนาน 10 วัน	45
4.7 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของยีสต์ที่แยกได้จากกระบวนการหมักคอมบูชา	48
4.8 การจัดจำแนกยีสต์บริเวณ ITS region	49

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

4.9 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียอะซิติก 52
4.10 การจัดจำแนกแบคทีเรียอะซิติกบริเวณ 16s rDNA 52
4.11 ค่าพีเอชของคอมบูชาจากชาอู่หลงหมักด้วยเชื้อผสมระหว่างยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 21 วัน 55
4.12 ปริมาณกรดทั้งหมด (ร้อยละอะซิติก) ของคอมบูชาจากชาอู่หลง หมักด้วยยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกในอัตราส่วนต่างๆ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 21 วัน 56
4.13 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของคอมบูชาด้วยเชื้อบริสุทธิ์ของยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน หมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 21 วัน 57
4.14 ปริมาณของแข็งที่ละลายทั้งหมดของคอมบูชาด้วยเชื้อบริสุทธิ์ของยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน หมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 21 วัน 59
4.15 ปริมาณแอลกอฮอล์ระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชาด้วยเชื้อบริสุทธิ์ของยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน หมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 21 วัน 61
4.16 ฤทธิ์ในการยับยั้งปฏิกริยาออกซิเดชัน ด้วยวิธี DPPH ของคอมบูชาด้วยเชื้อยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน หมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 21 วัน 62
4.17 การทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านความใสของคอมบูชาหมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์ของยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกที่แยกได้ในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 21 วัน 63
4.18 การทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านสีของคอมบูชาหมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์ของยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกที่แยกได้ในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน หมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 21 วัน 64
4.19 การทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นของคอมบูชาหมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์ของยีสต์และ แบคทีเรียอะซิติกที่แยกได้ในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน หมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 21 วัน 66
4.20 การทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นของคอมบูชาหมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์ของยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกที่แยกได้ในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน หมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 21 วัน 67
4.21 การทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านความชอบโดยรวมของคอมบูชาหมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์ของยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกแยกได้ในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน หมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 21 วัน 69
ข-1 แสดงการเตรียมสารละลาย Mcfarland Standard 83

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

ง-1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณของยีสต์ระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชาด้วยหัวเชื้อคอมบูชาจากแหล่งต่างๆ หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน 86

ง-2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียอะซิติกระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชา โดยใช้หัวเชื้อคอมบูชาจากแหล่งต่างๆ หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน 87

ง-3 การเปลี่ยนแปลงของพีเอชระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชาด้วยหัวเชื้อคอมบูชาจากแหล่งต่างๆ หมักที่อุณหภูมิห้องนาน 10 วัน 90

ง-4 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดทั้งหมด (ร้อยละกรดอะซิติก) ระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชาด้วยหัวเชื้อคอมบูชาจากแหล่งต่างๆ หมักที่อุณหภูมิห้องนาน 10 วัน 92

ง-5 ปริมาณแอลกอฮอล์และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรของไอโซเลตยีสต์ หมักในชาอู่หลงที่มีพีเอช 3.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน 94

ง-6 ปริมาณกรดทั้งหมด(ร้อยละกรดอะซิติก) ที่ผลิตได้จากไอโซเลตแบคทีเรียอะซิติกในชาอู่หลง หมักในสภาวะนิ่ง อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสนาน 10 วัน 95

ง-7 ค่าพีเอชของคอมบูชาจากชาอู่หลงหมักด้วยเชื้อผสมระหว่างยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกอัตราส่วนที่แตกต่างกัน ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 21 วัน 96

ง-8 ปริมาณกรดทั้งหมด (ร้อยละกรดอะซิติก) ของคอมบูชาจากชาอู่หลง หมักด้วยยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกในอัตราส่วนต่างๆ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 21 วัน 99

ง-9 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของคอมบูชาด้วยเชื้อบริสุทธิ์ของยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน หมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 21 วัน 101

ง-10 ปริมาณของแข็งที่ละลายทั้งหมดของคอมบูชาหมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์ของยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน หมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 21 วัน 104

ง-11 ปริมาณแอลกอฮอล์ระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชาด้วยเชื้อบริสุทธิ์ของยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน หมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 21 วัน 107

ง-12 ฤทธิ์ในการยับยั้งปฏิกริยาออกซิเดชัน ด้วยวิธี DPPH ของคอมบูชาด้วยเชื้อยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน หมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 21 วัน 109

ง-13 การทดสอบทางประสาทสัมผัสของคอมบูชาที่อัตราส่วน 3:7 112

ง- 14 การทดสอบทางประสาทสัมผัสของคอมบูชาที่อัตราส่วน 4:6 114

ง- 15 การทดสอบทางประสาทสัมผัสของคอมบูชาที่อัตราส่วน 5:5 116

ง- 16 การทดสอบทางประสาทสัมผัสของคอมบูชาที่อัตราส่วน 6:4 118

ง- 17 การทดสอบทางประสาทสัมผัสของคอมบูชาที่อัตราส่วน 7:3 120

ง- 18 การทดสอบทางประสาทสัมผัสของคอมบูชาที่ใช้หัวเชื้อทางการค้า 122

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาของงานวิจัย

เครื่องดื่มคอมบูชา (Kombucha tea) เครื่องดื่มเกิดจากการหมักชากับน้ำตาลด้วยจุลินทรีย์ที่ทำงานร่วมกันคือ ยีสต์ และ แบคทีเรียอะซิติกโดยยีสต์จะใช้น้ำตาลในชาหมักเปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์ ซึ่งจะกระตุ้นการเจริญเติบโตของแบคทีเรียอะซิติกที่จะใช้แอลกอฮอล์เปลี่ยนเป็นกรดอะซิติก (Jayabalan *et al*., 2008) คอมบูชาเป็นเครื่องดื่มที่ทำให้รู้สึกสดชื่นมีรสชาติคล้ายน้ำแอปเปิ้ลหมัก และมีความซ่าเล็กน้อย ช่วยส่งเสริมการทำงานของร่างกาย เสริมสร้างประสิทธิภาพการทำงานของระบบย่อยอาหาร (Roche, 1998) บรรเทาอาการของโรคไขข้ออักเสบ ส่งเสริมระบบขับถ่าย ป้องกันการติดเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรค เพิ่มภูมิต้านทานให้แก่ร่างกาย (Dufresne and Farnworth, 2000)

ถึงแม้ว่าคอมบูชาจะดีต่อสุขภาพ แต่หัวเชื้อคอมบูชาที่มีการผลิตแบบภูมิปัญญาชาวบ้านอาจมีความเสี่ยงสูงจากการปนเปื้อนจาก จุลินทรีย์หลายชนิด เช่น *Penicillium* spp. และ *Candida albicans* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดการปนเปื้อน สามารถแย่งอาหารจุลินทรีย์ที่สำคัญในคอมบูชา รวมถึงลดประสิทธิภาพของการหมัก เนื่องจากวิธีที่ใช้ไม่ปลอดเชื้อ และขาดความระมัดระวังในการถ่ายเชื้อ ถึงแม้ว่าคอมบูชาจะดีต่อสุขภาพ แต่วิธีการดั้งเดิมที่ใช้เซลลูโลสในการทำกล้าเชื้อ เป็นวิธีการที่ยากในการควบคุมจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ รวมถึงแบคทีเรียก่อโรค ยีสต์ และรา ในระหว่างทำการหมัก (Dufresne and Farnworth, 2000; Eric and Jessica, 2013) Nguyen *et al.,* (2015) ศึกษาการแยกเชื้อยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกและศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของเชื้อในการผลิตคอมบูชา พบว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุดคือ การผสมเชื้อ *Dekkera bruxellensis* KN89 และ *Gluconacetobacter intermedius* KN89 คือ 4:6 จะให้ปริมาณกรดกลูโคโรนิคสูง 175.8 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการหมัก 7 วัน และ Tehmeena *et al.,* (2016) ศึกษาการแยกเชื้อจากคอมบูชาพบยีสต์ คือ *Zygosaccharomyces bailli* และแบคทีเรียอะซิติก คือ *Komagataeibacter saccharivorans* ปัญญา และสกุณณี (2559) ได้คัดแยกแบคทีเรียอะซิติกจากหัวเชื้อคอมบูชาจากโรงงานและน้ำหมักผลไม้ สามารถคัดแยกแบคทีเรียอะซิติกได้ 38 ไอโซเลต เมื่อตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา และทดสอบทางชีวเคมี พบว่ามี 34 ไอโซเลตที่เป็นแบคทีเรียจีนัส *Acetobacter* sp. และ 4 ไอโซเลตเป็นแบคทีเรียจีนัส *Gluconacetobcter* sp.

ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกและจัดจำแนกจุลินทรีย์ในกลุ่มยีสต์และแบคทีเรียอะซิติก ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีบทบาทในกระบวนการหมักเครื่องดื่มคอมบูชา จากนั้นนำจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้มาใช้ร่วมกันในกระบวนการหมักคอมบูชา เพื่อให้การหมักคอมบูชามีประสิทธิภาพมากขึ้น และได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพสม่ำเสมอ ปราศจากการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ก่อโรค และเป็นแนวทางในการพัฒนาเครื่องดื่มคอมบูชาในระดับอุตสาหกรรม

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณของยีสต์และแบคทีเรียอะซิติก ในระหว่างการหมักคอมบูชา

1.2.2 คัดเลือกยีสต์ที่มีความสามารถในการทนกรดและผลิตแอลกอฮอล์ได้สูง คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียอะซิติกที่มีความสามารถในการผลิตกรดได้สูง มาใช้ในการจัดจำแนกสายพันธุ์ต่อไป

1.2.3 จัดจำแนกเชื้อยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกในระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชาโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การทดสอบทางชีวเคมี และใช้เทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุลในการจัดจำแนก

1.2.4 ศึกษาอัตราส่วนของเชื้อยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกที่คัดเลือกได้ นำมาใช้เป็นหัวเชื้อในการหมักคอมบูชา เพื่อพัฒนากระบวนการหมักให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1.3.1 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณของยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกในระหว่างการหมักคอมบูชาเป็นเวลา 10 วัน โดยใช้หัวเชื้อจาก 3 แหล่งคือ กรุงเทพมหานคร นนทบุรี และ เชียงใหม่

1.3.2 คัดแยกเชื้อยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกในระหว่างการหมักคอมบูชา จากนั้นคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่มีความสามารถในการทนกรดและผลิตแอลกอฮอล์ได้สูง และคัดเลือกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการผลิตกรดได้สูง มาใช้ในการจัดจำแนกสายพันธุ์

1.3.3 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี และเทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุลในการจัดจำแนกสายพันธุ์ของยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกที่คัดเลือกได้

1.3.4 นำสายพันธุ์ของเชื้อยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกที่คัดเลือกมาใช้ในกระบวนการหมักคอมบูชา โดยศึกษาอัตราส่วนของเชื้อยีสต์และแบคทีเรียอะซิติก เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์คอมบูชาที่มีคุณภาพ มีการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ ทางเคมี และทดสอบทางประสาทสัมผัสดูการยอมรับของผู้บริโภคต่อผลิตภัณฑ์คอมบูชา

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถนำเชื้อยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกที่แยกได้จากกระบวนการหมักคอมบูชา มาใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในกระบวนการหมักคอมบูชา เพื่อพัฒนากระบวนการหมักให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพสม่ำเสมอ ปราศจากการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ก่อโรค รวมทั้งเป็นแนวทางในการพัฒนาเครื่องดื่มคอมบูชาในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

บทที่ 2

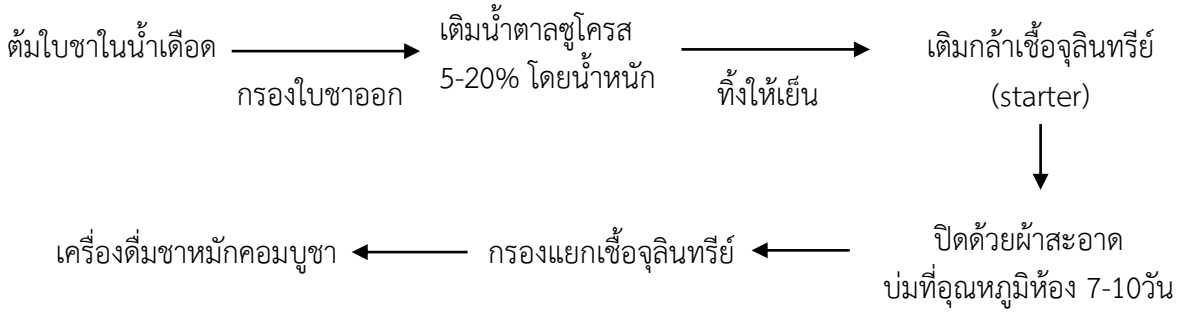
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 คอมบูชา (Kombucha)

คอมบูชา เป็นเครื่องดื่มชาหมักเพื่อสุขภาพ ชาวจีนนิยมดื่มกันมาหลายสิบปีจนสืบทอดมาจนถึงปัจจุบันและแพร่หลายไปทั่วโลก เนื่องจากเป็นเครื่องดื่มที่ให้ความสดชื่นและฟื้นฟูร่างกาย (Liu *et al*., 1996 ; Srihari and Satayanarayana,2012) ในพ.ศ. 212 สมัยราชวงศจิ้น เรียกน้ำหมักชีวภาพชนิดนี้ว่า ชาแดงเห็ด (hongchajun) มีความเชื่อว่าเป็น ชาอมตะ ที่เกิดจากการหมักชาจนเกิดเป็นแผ่นวุ้นขึ้น โดยแผ่นวุ้นที่เกิดขึ้นมีลักษณะคล้ายเห็ดแดง หลังจากนั้นเริ่มมีการเผยแพร่ไปยังประเทศเกาหลีใน พ.ศ. 957 นายแพทย์คอมบู (Kom-Bu) นายแพทย์คอมบูนำชาหมักถวายแก่พระจักรพรรดิญี่ปุ่นโดยอ้างว่าสามารถรักษาได้สารพัดโรค ทำให้ชาหมักถูกเรียกว่า คอมบูชา (Kombucha) ตั้งแต่นั้นมา ขณะเดียวกันความเชื่อนี้ยังมีการเผยแพร่ไปยังประเทศอินเดีย รัสเซีย เยอรมัน เอเชียตะวันออกกลาง และสหรัฐอเมริกา มีชื่อเรียกต่างกันในแต่ละประเทศ เช่น Haipo, Tea fungus, Manchurian tea, Kargasok tea เป็นต้น (Kurtzman *et al*., 2001)

2.2 กระบวนการหมักคอมบูชา

โดยทั่วไปเครื่องดื่มคอมบูชาเตรียมได้จากชาดำหรือชาเขียวร้อยละ 1-2 ต้มในน้ำเดือดเพื่อสกัดสารอาหารและแร่ธาตุต่าง ๆ ออกจากใบชา เติมน้ำตาลซูโครสร้อยละ 5-10 ในปริมาณที่เหมาะสม เพื่อใช้เป็นแหล่งสารอาหารในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ จากนั้นเติมน้ำหมักของหัวเชื้อคอมบูชาร้อยละ 10-20 และแผ่นเซลลูโลสของหัวเชื้อคอมบูชาร้อยละ 2.5-5.0 บ่มที่อุณหภูมิ 25 – 37 ℃ เป็นเวลา 7-10 วัน เพื่อให้จุลินทรีย์ดำเนินกิจกรรมการหมัก (Kallel *et al*., 2012) แสดงดังรูปที่ 2.1 สิ่งที่สำคัญอย่างมากในขั้นตอนของการผลิตชาหมักคอมบูชา คือ อุปกรณ์และพื้นที่ในการทำงานจะต้องสะอาดปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ การควบคุมการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ และการป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ (Contamination) (Watawana *et al*., 2015)



รูปที่ 2.1 กระบวนการผลิตชาหมักคอมบูชา
ที่มา: Vina *et al*., (2013)

แต่เดิมชาหมักคอมบูชาไม่มีมาตรฐานการผลิตที่ชัดเจน เนื่องจากเป็นการผลิตในระดับครัวเรือนเท่านั้น วิธีการผลิตจึงเป็นแบบสืบทอดต่อกันมา โดยเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการหมักเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ ทำให้ไม่ทราบชนิดและปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่ดำเนิน

กิจกรรมในระหว่างกระบวนการหมัก และเมื่อต้องการหมักคอมบูชาอีกครั้งก็จะนำเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้จากการหมักครั้งก่อนมาใช้เป็นหัวเชื้อ ซึ่งจากการสำรวจความปลอดภัยของเครื่องดื่มชาหมักคอมบูชา พบว่ามีอัตราการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคน้อยมาก ส่งผลให้ชาหมักคอมบูชามีความปลอดภัยในการบริโภค (Liu *et al*., 1996 ; Greenwalt *et al*., 2000) มีงานวิจัยที่สนใจศึกษาเกี่ยวกับเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก พบว่าคอมบูชาเกิดจากกลุ่มเชื้อแบคทีเรียอะซิติกและเชื้อยีสต์ โดยเชื้อแบคทีเรียอะซิติกที่พบเป็นชนิดที่ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต (aerobic bacteria) ส่วนเชื้อยีสต์มีบทบาทในการผลิตแอลกอฮอล์ในกระบวนการหมัก (Asai, 1968) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ โดยวิธีการแยกเชื้อจุลินทรีย์ทั้งในแผ่นเซลลูโลสและน้ำหมักของคอมบูชา พบว่าเมื่อทำการทดสอบทางชีวเคมี (biochemical) และศึกษาลักษณะทางกายภาพ (physiological) เพื่อระบุสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากทั้งสองกลุ่ม พบว่าในกลุ่มของแบคทีเรียเป็นพวก *Acetobacter xylinum, Acetobacter aceti, Acetobacter pasteurianus, Acetobacter xylinoides, Gluconobacter oxydans, Ruminococcaceae Incertae Sedis, Lactococcus* sp., *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* sp., *Allobacullum* sp., *Enterococcus* sp., *Thermus* sp. และ *Gluconoacetobacter* (Battikh *et al*., 2011 ; Vina *et al*., 2013 ; Marsh *et al*., 2014) ในกลุ่มของยีสต์ส่วนมากเป็นสายพันธุ์ที่มีความสาคัญต่ออุตสาหกรรมอาหารหมักและเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ มีคุณสมบัติเด่น คือ ทนต่อแรงดันออสโมซิส (osmophilic yeast) และเป็นสายพันธุ์ที่ทนกรด ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe, Zygosaccharomyces rouxii*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Brettanomyces bruxellensis* และ *Brettanomyces lambicus* นอกจากนี้ยังพบยีสต์สายพันธุ์อื่นๆ ที่ไม่ค่อยสำคัญในกระบวนการหมัก ได้แก่ *Candida* sp., *Torulaspora delbrueckii*, *Koleckera apiculata*, *Torulopsis* sp., *Pichia*, และ *Mycoderma* (Teoh *et al*., 2004 ; Battikh *et al*., 2011 ; Vina *et al*., 2013 ; Jayabalan *et al*., 2014 ; Marsh *et al*., 2014)

คอมบูชามีส่วนประกอบ 2 ส่วนคือ แผ่นเซลลูโลสที่ลอยอยู่บนน้ำหมัก และน้ำหมัก รวมทั้งกรดอะซิติก เอทานอล และกรดกลูโคนิกเป็นส่วนประกอบหลักของน้ำหมัก และองค์ประกอบอื่นๆ เช่น กรดแลคติก กรดกลูโคโรนิค เป็นต้น รสชาติของชาหมักจะมีรสหวานเล็กน้อยและมีรสเปรี้ยวคล้ายกับเครื่องดื่มไซเดอร์ (Cider) เนื่องจากมีส่วนผสมของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และแอลกอฮอล์ปนอยู่ด้วย (Jayabalan *et al.,* 2014) กระบวนการหมักคอมบูชาอาศัยจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียอะซิติกและกลุ่มยีสต์ โดยยีสต์เปลี่ยนน้ำตาลซูโครสให้เป็นน้ำตาล ฟรุกโตสและกลูโคส และผลิตเอทานอล ในสภาวะที่มีเอทานอลจะกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียอะซิติกเปลี่ยนกลูโคสให้เป็นกรดกลูโคนิค และเปลี่ยนฟรุกโตสให้เป็นกรดอะซิติก เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักจะมีผลิตภัณฑ์สองส่วนประกอบด้วย เซลลูโลสซึ่งเป็นผลพลอยได้จากแบคทีเรียอะซิติก และส่วนน้ำหมักคอมบูชา ชาที่เหมาะสำหรับการผลิตคอมบูชา คือ ชาเขียวและชาดำ (*Camellia sinensis* (L.) O. kuntze) องค์ประกอบในใบชาประกอบด้วยโพลิฟีนอล (polyphenols) โดยสารประกอบโพลิฟีนอลส่วนใหญ่เป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ซึ่งกลุ่มของฟลาโวนอยด์ที่พบมากคือ ฟลาโวนอล (flavonols) หรือเรียกว่า คาเทชิน (catechins) (Dufresne and Farnmorth, 2000) องค์ประกอบของคอมบูชา พบว่ามีสารที่มีประโยชน์ต่อร่างกายหลายชนิด เช่น โพลีฟีนอล กรดกลูโคนิค กรดกลูโคโรนิค กรดแลคติก วิตามิน กรดอะมิโน และยาปฏิชีวนะ เป็นต้น (Jayabalan *et al.,* 2008)

สารต้านอนุมูลอิสระดังกล่าวช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็ง โรคไขข้ออักเสบ นอกจากนี้ยังช่วยในการทำงานของไตได้อีกด้วย

2.3 จุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการผลิตคอมบูชา

2.3.1 ยีสต์ (Yeasts)

ยีสต์จัดเป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวที่อยู่ในอาณาจักรเห็ดรา (Fungi) ส่วนใหญ่เพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศ โดยการแตกหน่อ (budding) มีจำนวนน้อยที่สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ โดยยีสต์ใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด เช่น กรดอินทรีย์ แอลกอฮอล์ เป็นต้น ยีสต์แต่ละชนิดมีแหล่งที่อยู่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับลักษณะทางสรีรวิทยาของยีสต์ เช่น ความสามารถในการใช้สารประกอบบางชนิด และความสามารถในการเจริญในสภาวะแวดล้อมนั้นๆ (Fell and Kurtman, 1996) ยีสต์ส่วนใหญ่มีรูปร่างแตกต่างกันออกไป ได้แก่ทรงกลม รี บางสายพันธุ์มีลักษณะเซลล์ยืดยาวออกต่อกันคล้ายเส้นใย (Matinee, 2011)

2.3.1.1 เกณฑ์ในการจัดจำแนกประเภทยีสต์

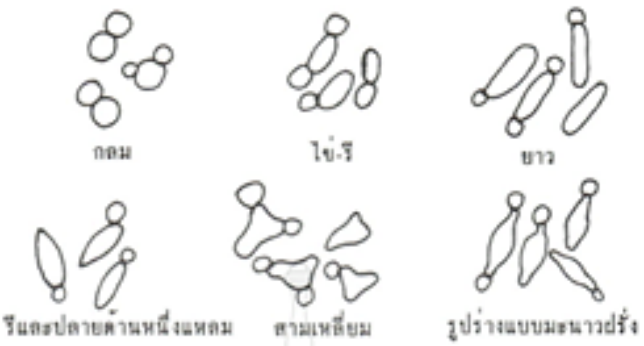
ยีสต์จำแนกประเภทโดย ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี รวมทั้งเกณฑ์ของอนุกรมวิธานเคมี และอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล ดังนี้ (Van Der Walt and Yarrow, 1984; Yarrow,1998)

ลักษณะสัณฐานวิทยาของยีสต์

สัณฐานวิทยาทั้งที่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศและการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศมีความสำคัญในอนุกรมวิธาน โดยปกติใช้สำหรับการจำแนกประเภทในระดับสกุลหรือกลุ่มอนุกรมวิธานที่สูงกว่าสกุล

ลักษณะของเซลล์

ยีสต์มีรูปร่างเซลล์หลายแบบ เช่น กลม (round, spheroidal, spherical) ค่อนข้างกลม (subglobose) รูปไข่(oval, ovoidal) รี (ellipsoidal) ทรงกระบอก (cylindrical) ยาว (elongated) แหลมหัวแหลมท้ายแบบมะนาวฝรั่ง (apiculate) เป็นสาย (filamentous) รีและปลายด้านหนึ่งแหลม (ogival) สามเหลี่ยม (triangular) และคนโท หรือ ฟลาสก์ (flask) เป็นต้น รูปที่ 2.4 การศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์ซึ่งอาจใช้เซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเหลวหรือบนอาหารแข็งก็ได้ (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

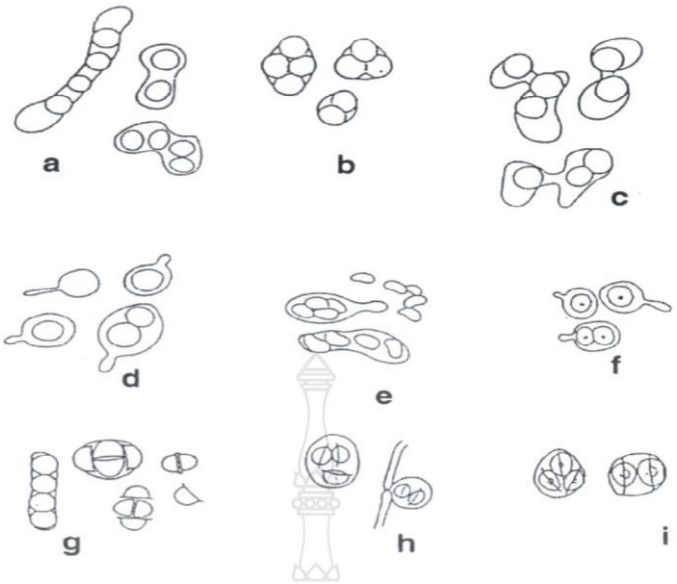


รูปที่ 2.2 รูปร่างของยีสต์แบบต่าง ๆ

ที่มา : สาวิตรี ลิ่มทอง (2549)

สำหรับอาหารเหลวที่นิยมใช้สำหรับศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์ คือ malt extract broth หรือ glucose peptone yeast extract (GPY) broth หรือ yeast extract malt extract (YM) broth แต่ยีสต์บางชนิดอาจต้องใช้อาหารเฉพาะ ส่วนอาหารแข็งก็เช่นเดียวกัน ใช้เพื่อศึกษาทั้งสัณฐานวิทยาของเซลล์ และลักษณะการเจริญของเชื้อบนอาหารแข็ง อาหารแข็งที่ใช้มากที่สุด คือ yeast extract peptone dextrose agar (YPD agar) หรือ glucose peptone yeast extract agar (GPY agar) และ malt extract agar โดยอาจใช้ในรูปของอาหารแข็งเอียง หรือถ้าใช้ morphology agar อาจใช้เทคนิค Dalmau plate หรือ agar-covered slide สำหรับยีสต์บางชนิดอาหารอื่นอาจเหมาะสมกว่า เช่น *Bullera, Cryptococcus, Leucosporidium, Rhodosporidium*, *Rhodotorula* และ *Sporobolomyces* มักอยู่ได้นานกว่าบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) (Barnett *et al*., 2000)

ยีสต์มีลักษณะของโคโลนีหลายแบบ เช่น เป็นเมือก (mucoid) ซึ่งมักแสดงว่ามี การสร้างแคปซูล ส่วนการเกาะกันเป็นก้อนเหนียวมักจะสัมพันธ์กับการสร้างเส้นใยเทียมหรือเส้นใยแท้ สำหรับสีของโคโลนีนั้นยีสต์ส่วนใหญ่จะมีโคโลนีสีขาว ครีม หรือน้ำตาล แต่บางชนิดอาจมี สีเหลือง ส้ม และแดง เช่น *Rhodotorula, Sporobolomyces* และ *Phaffia* เนื่องจากความสามารถในการสร้างรงควัตถุคาโรทีนอยด์ (carotenoid pigment) สำหรับผิวหน้าของโคโลนีมีหลายแบบเช่นกัน เช่น เรียบ (smooth) หยาบ (rough) เป็นส่วนของวงกลมที่ตัดออกโดยเส้นรัศมีสองเส้น (sector) ด้าน (dull) และเป็นมันวาว (glistening) ยีสต์บางชนิดอาจมีโคโลนีแบนราบ (flat) กระจายทั่วไป (spreading) และ นูน (raised) นอกจากนั้น ขอบของโคโลนีอาจเรียบ โค้งเว้า (lobate) ขอบไม่เรียบคล้ายรากพืช (rhizoid) และเป็นคลื่น (undulating)



รูปที่ 2.3 รูปร่างของแอสคัสและแอสโคสปอร์ (a) กลมและค่อนข้างรี; *Schizosaccharomyces pombe* (b) กลมและรูปไข่; *Saccharomyces cerevisiae* (c) กลมและรูปไข่ (d) (e) รูปไต; *Kluyveromyces marxianus*, (f) กลมและผนังเป็นรอยหยักที่ผิว (g) รูปร่างเป็นหมวกทหาร (helmet-shaped) หรือรูปร่างครึ่งวงกลม (hemispherical); *Pichia membranaefaciens*, (h) รูปร่างเป็นหมวก (hat-shaped); *Saccharomycopsis fibuligera* และ (i)รูปร่างเป็นดาวเสาร์ (Saturn-shaped)และผิวเรียบ; *Williopsissaturnus*

ที่มา : Nakase (2001)

ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

ลักษณะทางสรีรวิทยา และชีวเคมีที่มีความสำคัญสำหรับการจำแนกประเภทยีสต์ ในระดับสปีชีส์ คือ การหมักคาร์โบไฮเดรตและการใช้สารประกอบคาร์บอน การเจริญบนแหล่งไนโตรเจน ความต้องการวิตามิน การเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ การเจริญบนอาหารที่มีน้ำตาลหรือเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นสูง การไฮโดรไลซ์ยูเรีย และ ความทนต่อสารปฏิชีวนะ (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

อนุกรมวิธานระดับโมเลกุลของยีสต์

วิธีที่ใช้จัดจำแนกประเภท และจัดจำแนกยีสต์โดยวิธีดั้งเดิมอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีซึ่งเป็นการตรวจฟีโนไทป์ของเชื้อ เป็นวิธีที่ใช้เวลานาน ไม่แม่นยำ และขาดความสามารถในการแยกที่ชัดเจน รวมทั้งมักมีข้อผิดพลาดและมีข้อโต้แย้งมาก ความก้าวหน้าของชีววิทยาระดับโมเลกุล ทำให้มีความเป็นไปได้ที่จะศึกษาลักษณะของยีสต์ที่ระดับจีโนมซึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างมากในการจัดจำแนกประเภทและสปีชีส์ สำหรับอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลประกอบด้วย การศึกษาระดับดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอซึ่งรวมทั้งการศึกษาองค์ประกอบของเบสในลำดับนิวคลีโอไทด์

วิธีระบุชนิดโดยใช้ดีเอ็นเอ

การทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA finger printing) คือ วิธีการสำหรับการทำให้เกิดรูปแบบที่เป็นเอกลักษณะของดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิต วิธีการเหล่านี้ช่วยให้ระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตได้ วิธีการระบุชนิดโดยใช้ดีเอ็นเอ (DNA typing methods) ที่สำคัญประกอบด้วย คารีโอไทปิง (karyotyping) โดยใช้ pulsed field gel electrophoresis (PFGE) การวิเคราะห์จีโนมโดย random amplified polymorphic DNA (RAPD) การวิเคราะห์ amplified fragment length polymorphism (AFLP) การวิเคราะห์ restriction fragment length polymorphism (RELP analysis) ของ amplified ribosoma DNA และการวิเคราะห์ Microsatellite

การคัดแยกยีสต์เพื่อนำไปใช้ประโยชน์

วิธีการแยกยีสต์ การแยกยีสต์มีหลายเทคนิคขึ้นกับลักษณะของตัวอย่างที่นำมาแยกดังนี้

1. การแยกยีสต์โดยใช้เทคนิคการเจือจาง (yeast isolation by dilution technique)

การแยกเชื้อวิธีนี้จัดเป็นวิธีทางอ้อมโดยการนำตัวอย่าง มาทำเป็นของแขวนลอย หรือสารละลายโดยทั่วไปมักจะใช้เครื่องตีปั่น (blender) ช่วย จากนั้นจึงนำไปspread ลงบนผิวหน้าอาหารแข็งในจานเพาะเชื้อหรือนำไปกรองผ่านเมนเบรนเพื่อให้เซลล์ยีสต์ติดอยู่บนแผ่นกรองเมนเบรน จากนั้นจึงนำแผ่นกรองเมมเบรนนั้นไปวางบนอาหารแข็งในจานเพาะเชื้อ ข้อพึงระวังในระหว่างการทำให้ตัวอย่างเจือจาง คือ ป้องกันการเพิ่มและลดจำนวนของยีสต์ การเพิ่มจำนวนอาจเกิดจากการให้อากาศ (aeration) ทำให้ยีสต์เจริญเพิ่มจำนวน ส่วนการที่ยีสต์ลดจำนวนลง อาจเนื่องมาจากตัวทำเจือจางไม่เหมาะสมทำให้ยีสต์ตาย การลดปัญหาที่ยีสต์เพิ่มจำนวนในระหว่างกระบวนการแยกเชื้ออาจทำได้โดยการใช้ตัวทำเจือจางที่เย็นและทำในสภาวะที่เย็น

2 การแยกยีสต์โดยเทคนิคการเพิ่มจำนวน (yeast isolation by enrichment technique)

วิธีนี้เป็นวิธีที่ใช้แยกยีสต์ในตัวอย่างที่มียีสต์จำนวนน้อยโดยการส่งเสริมให้ยีสต์ชนิดหนึ่ง

เจริญมากกว่ายีสต์ชนิดอื่นหรือจุลินทรีย์อื่น วิธีนี้ไม่สามารถใช้นับจำนวนยีสต์ในตัวอย่างที่นำมาตรวจได้เพราะยีสต์บางชนิดมีการเพิ่มจำนวนในระหว่างการแยก วิธีปฏิบัติคือใส่ตัวอย่างลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่ส่งเสริมเฉพาะการเจริญของยีสต์ชนิดใดชนิดหนึ่งหรือทุกชนิด นำไปบ่มบนเครื่องเขย่านาน 12-24 ชั่วโมง หรือจนยีสต์เจริญ นำอาหารเหลวที่มียีสต์เจริญอยู่ไปขีดลงบนผิวหน้าอาหารแข็งในจานเพาะเชื้อ เมื่อมีโคโลนีของยีสต์เจริญขึ้นมาเก็บโคโลนี และ นำมาแยกเชื้อบริสุทธิ์

3 การแยกยีสต์โดยเทคนิคการกรองด้วยเมมเบรน (yeast isolation by membrane filtration technique)

การแยกเชื้อวิธีนี้อาจจะใช้ทั้งในกรณีที่ตัวอย่างเป็นของเหลว และของแข็ง โดยตัวอย่างที่เป็นของแข็งต้องนำมาเตรียมเป็นสารละลายหรือของแขวนลอย สำหรับการกรองนั้นแผ่นกรองเมมเบรนที่ใช้อาจจะต้องมีขนาด 0.8-1.2 ไมครอน หรือถ้ายีสต์มีขนาดเล็กมากอาจจะต้องใช้ขนาด 0.45 ไมครอน ซึ่งยีสต์และจุลินทรีย์อื่นที่มีขนาดใหญ่จะติดอยู่บนแผ่นกรองเมมเบรน จากนั้นจึงนำแผ่นกรองเมมเบรนไปวางบนผิวหน้าอาหารแข็งที่เหมาะสำหรับยีสต์ จนกว่าจะมีโคโลนีของยีสต์เจริญขึ้นมา (รุ่งนภา และวราวุฒิ ครูส่ง, 2532)

4 การแยกเชื้อบริสุทธิ์ เมื่อมีการเจริญของเชื้อแล้วการได้เชื้อบริสุทธิ์ อาจทำโดยนำโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็ง streakบนอาหารแข็งที่เหมาะสม เช่น อาหารแข็ง YM และ อาหารแข็ง YPD ซึ่งลดการปะปนของแบคทีเรียโดยการปรับให้อาหารที่มีสภาพเป็นกรด หรือการเติมสารปฏิชีวนะ ควรตรวจโคโลนีของเชื้อบนจานเพาะเชื้อที่กำลังแยกเชื้อทุกๆวัน จนโคโลนีมีขนาดใหญ่พอที่จะเห็นความแตกต่างของโคโลนี การตรวจโคโลนีในจานเพาะเชื้อควรใช้แว่นขยาย กำลังขยาย 4 เท่าหรือกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยายต่างๆ เพื่อดูว่าสี ขนาด และ รูปร่างของโคโลนีควรนับจำนวนโคโลนีแต่ละแบบและเลือก 2-3 โคโลนีเป็นตัวแทนสำหรับการแยกเชื้อบริสุทธิ์ และศึกษาต่อไป โดยเลือกโคโลนีที่มีลักษณะต่างกันและแยกห่างจากกันมาทำการsterak ซ้ำอีกครั้ง ทันทีหรือเตรียมเซลล์แขวนลอยในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ หรือถ้าทำไม่ได้ในทันทีให้ถ่ายเชื้อไปยังอาหารแข็งเอียงในหลอดก่อนแล้วจึงนำออกมาแยกเชื้อบริสุทธิ์ภายหลัง

2.3.1.2 ยีสต์ที่พบในกระบวนการผลิตคอมบูชา ได้แก่ *Schizosacharomyces pombe, Saccharomoyces ludwigii, Saccharomyces cerevisiae, Zygosacharomyces bailii, Brettanomyces bruxellensis, Brettanomyces lambicus* และ *Candida stellate* เป็นต้น (Battikh *et al*., 2012)

2.3.2 แบคทีเรียอะซิติก (Acetic acid bacteria)

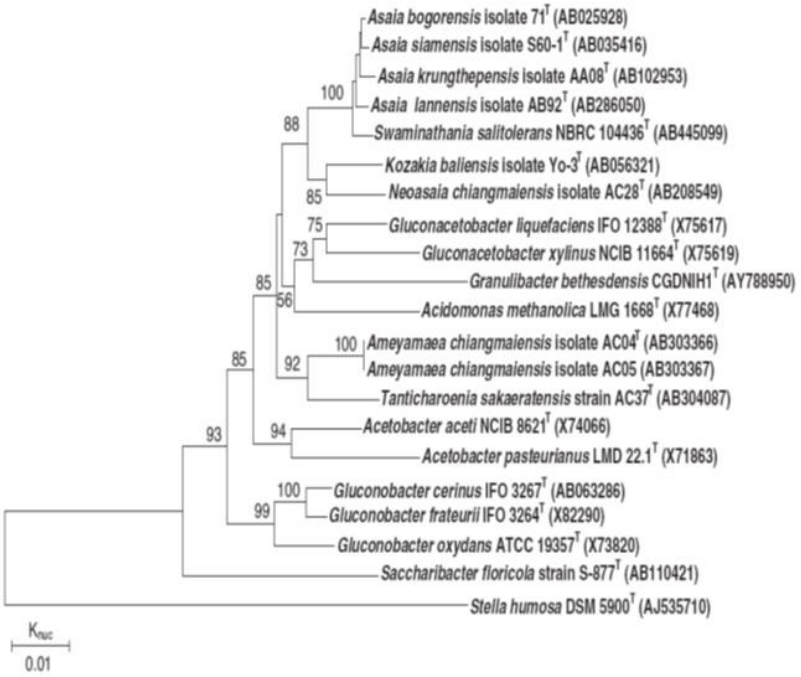
เป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่มีความสามารถในการผลิตกรดน้ำส้มสายชู มีประโยชน์และความสำคัญในอุตสาหกรรมหลายชนิด เช่น การผลิตน้ำส้มสายชู เพิ่มรสชาติในการประกอบอาหาร เช่น พริกดองในการปรุงรสก๋วยเตี๋ยว ใช้ในการถนอมอาหาร เช่น ดองผัก ผลไม้ เป็นต้น แบคทีเรียชนิดนี้ยังเป็นส่วนสำคัญในการทำเครื่องดื่มบำรุงกำลังและรักษาสุขภาพ เช่น น้ำหมักเห็ดรัสเซีย (Tea fungus or Kombucha) ซึ่งเป็นเครื่องดื่มสุขภาพที่แพร่หลายในจีน ญี่ปุ่น และ อินเดีย (Kersters *et al*., 2006)

2.3.2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียอะซิติก

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (gram-negative) ต้องการออกซิเจนในการเจริญ (aerobic) ไม่สร้างสปอร์ (non spore forming) รูปร่างท่อนจนถึงกลมรี สามารถเคลื่อนที่ได้เนื่องจากมี flagella ชนิด peritrichous และ polar ขึ้นอยู่กับแต่ละจีนัส มีการเจริญเป็นแบบเซลล์เดี่ยว หรือติดกันเป็นคู่หรือเป็นสายเซลล์ ความกว้างระหว่าง 0.4 - 1 ไมโครเมตร ยาวประมาน 0.8 - 4.5 ไมโครเมตร ให้ผลการทดสอบคะตาเลสเป็นบวก (catalase positive) ออกซิเดสเป็นลบ (oxidase negative) ช่วงสภาวะของค่าพีเอช ที่มีความเหมาะสมในการเจริญอยู่ที่ 5.0 - 6.5 แต่สามารถเจริญได้ในที่มีค่าพีเอช ต่ำที่ 3.0–4.0 แบคทีเรียอะซิติกมีความสามารถในการออกซิไดซ์น้ำตาล และแอลกอฮอล์ได้เป็นกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดน้ำส้ม (Acetic acid) นอกจากนี้แบคทีเรียอะซิติกสามารถออกซิไดซ์น้ำตาลแอลกอฮอล์ (alcohol sugar) เป็นน้ำตาลชนิดต่างๆ เช่น น้ำตาลแมนนิทอลเป็นน้ำตาลฟรุกโตส (Gupta *et al*., 2001)

2.3.2.2 การจัดจำแนกแบคทีเรียอะซิติก

ในอดีตแบคทีเรียกรดอะซิติกถูกจัดจำแนกไว้เพียง 2 จีนัสคือ *Acetobacter* และ *Gluconobacter* แต่ในปัจจุบันการจัดจำแนกด้วยเทคนิคทางพันธุกรรม (genetic molecular) เข้ามามีบทบาทในการจัดจำแนกแบคทีเรียอะซิติกใหม่ได้เป็นจำนวน 12 จีนัสด้วยกัน ประกอบด้วย *Acetobacter, Gluconobacter, Acidomonas, Gluconacetobacter, Asaia, Kozakia, Swaminathania*, *Saccharibacter*, *Neoasaia, Granulibacter, Tanticharoenia* และ *Ameyamaea* อยู่ในแฟมิลี่ *Acetobacteraceae* (Yamada and Yukphan, 2008; Yukphan *et al*., 2008 ; 2009) รูปที่ 2.6 โดยการจัดจำแนกดังกล่าวอาศัยพื้นฐานการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และความสัมพันธ์ตามลำดับวิวัฒนาการบริเวณ 16S rDNA (Sievers *et al.,* 1994 ; Yamada *et al.,* 2000) รวมไปถึงลักษณะทางฟีโนไทด์ของแบคทีเรียที่ผลิตกรดน้ำส้มสายชูและความเหมือนกันของสารพันธุกรรม



รูปที่ 2.4 แสดงลักษณะความสัมพันธ์ทางสายการวิวัฒนาการของแบคทีเรียผลิตอะซิติก ใน Family *Acetobacteraceae* โดยอาศัยพื้นฐานการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และความสัมพันธ์ตามลำดับวิวัฒนาการบริเวณ 16S rDNA

ที่มา: Yukphan *et al*., (2009)

ในปี 2011 Sengun and Karabiyikli ได้จำแนกแบคทีเรียอะซิติกออกเป็น 12 สกุล แสดงดังตารางที่ 2.1 และตารางที่ 2.2 ดังนี้

1. *Acetobacter* (Beijerinck, 1898)

Acetobacter มีรูปร่างเป็นรูปไข่ ท่อนตรงหรือโค้งเล็กน้อยขนาด 0.6-0.8 x 1.0-4.0 ไมโครเมตร พบเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ หรือเรียงกันเป็นเส้นสาย บางสายพันธุ์อาจพบลักษณะเป็นเกลียวยืดยาว บวม รูปกระบอก โค้งหรือเป็นสาย มีทั้งเคลื่อนที่ได้และเคลื่อนที่ไม่ได้ จะมีแฟลกเจลลารอบเซลล์ (peritrichous flagella) ไม่สร้างเอนโดสปอร์ (endospore) ติดสีแกรมลบ ต้องการออกซิเจนในการเจริญ (obligately aerobic) ไม่เกิดการหมัก ส่วนมากไม่สร้างรงควัตถุ โคโลนีมีสีขาวสามารถออกซิไดซ์อะซิเตท และแลกเตท ไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) และน้ำ(H_2O) (De Ley and Swing, 1984) *Acetobacter* มียูบิควิโนน-9 (Ubiquinol,Q-9) (Yamada *et al.,* 1968) ผลิตเอนไซม์คะตะเลส (catalase) แต่ไม่ผลิตเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase) ไม่ย่อยสลายเจลลาติน ผลิตอินโดล สร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และแอมโมเนียจากแอล-อาร์จินิน (L-arginine) แหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดสำหรับการเจริญของเชื้อ คือ เอทานอล (ethanol) กลีเซอรอล (glycerol) และแลกเตท (lactate) สามารถสร้างกรดจากเอ็น-โพรพานอล (*n*-propanol) เอ็น-บิวทานอล (*n*-butanol) และดี-กลูโคส (D-glucose) ไม่ย่อยแลกโตสและแป้ง อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญคือ 25-30 องศาเซลเซียสช่วงพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 5.4-6.3 (Holt *et al.,* 1994) ปัจจุบันมีสมาชิกทั้งหมด 16 สายพันธุ์ ได้แก่ *Acetobacter aceti*, *A. orleanensis*, *A. estunensis*, *A. indonesiensis*, *A. tropicalis*, *A. cibinongensis*, *A. orientalis*, *A.cerevisiae*, *A. malorum*, *A.*

oeni, *A. nitrogenifigens*, *A. pasteurianus*, *A. peroxydans*, *A.pomorum*, *A. lovaniensis*, *A. syzygii* (Sokollek *et al*., 1998; Lisdiyanti *et al*., 2000, 2001; Cleenwerck *et al*., 2002; Silva *et al*., 2006; Dutta and Gachhui, 2006)

2 *Gluconobacter* (Asai, 1935)

เซลล์มีรูปร่างรีถึงเป็นท่อน ขนาด 0.5-1.0 x 2.6-4.2 ไมโครเมตร พบเป็นเซลล์เดี่ยวหรือเป็นคู่ไม่ค่อยพบต่อกันเป็นสายยาว อาจพบเป็นเซลล์ผิดปกติขนาดใหญ่ (Holt *et al.,*1989) ไม่สร้างเอนโดสปอร์ ติดสีแกรมลบ มีทั้งแบบเคลื่อนที่ได้และเคลื่อนที่ไม่ได้ ถ้าเคลื่อนที่ได้จะมี polar flagella 3-8 อัน โคโลนีสีขาวหรือสีครีม มีลักษณะคล้ายกับสกุล *Acetobacter* แต่แตกต่างกันที่ไม่สามารถออกซิไดซ์อะซิเตทและเลกเตทไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ (De Leyand Swing, 1984) มียูบิควิโนน-10 (Ubiquinol, Q-10) (Yamada *et al.,* 1968) ผลการทดสอบออกซิเดส(oxidase) การรีดิวซ์ไนเตรท (nitrate reduction) และการผลิตอินโดล (indole) เป็นลบ ไม่ย่อยเจลลาติน สร้างคีโตนจากโพลีแอลกอฮอล์อย่างรวดเร็ว (strong ketogenesis) สร้างกรดจากน้ำตาลดี-กลูโคส และดี-ไซโลส ทุกสายพันธุ์มีการผลิตกรด 2-คีโตน กลูโคนิก (2-ketogluconic acid) และกรด 5-คีโตน กลูโคนิก (5-ketogluconic acid) อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ คือ 25-30 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ช่วงความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 5.5-6.0 ส่วนใหญ่สามารถเจริญได้ที่พีเอสต่ำ (pH 3.6) (Holt *et al.,* 1994) ปัจจุบันมีสมาชิกทั้งหมด 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Gluconobacter oxydans, G. asai, G. cerinus, G. albidus, G. thailandicus* (Somboon *et al.,* 2004)

3 *Acidomonas* (Urakami *et al*., 1989)

Acidomonas ประกอบด้วยสมาชิกเพียงสายพันธุ์เดียวคือ *Acidomonas methanolica* (Urakami *et al*., 1989) ซึ่งแตกต่างจากแบคทีเรียอะซิติกตัวอื่นๆ เนื่องจากสามารถใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งพลังงานได้ดีกว่ากลีเซอรอล หรือกลูโคส *Acidomonas* มี ยูบิควิโนน-10 (Urakami *et al*.,1989). *Acidomonas* มีขนาด 0.8-1.0 x 1.5-3.0 ไมโครเมตร เซลล์ไม่เคลื่อนที่ ลักษณะโคโลนีบนอาหาร peptone-yeast extract-malt extract มีลักษณะเป็นมัน ขอบเรียบ ผิวเรียบ สีขาวจนถึงเหลืองอ่อนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-3 มิลลิเมตร หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ให้ผลการทดสอบออกซิเดส คะตาเลสและยูรีเอสเป็นบวก และให้ผลการทดสอบ อินโดล การรีดิวซ์ไนเตรทและโวเจสโพรสเคอร์ (Voges-Proskauer) เป็นลบ ไม่ย่อยเจลลาตินและแป้ง สร้างกรดอะซิติกจากเอทานอล ผลิตกรดจากน้ำตาลดี-กลูโคส สามารถใช้เมทานอล เอทานอล กรดอะซิติก น้ำตาลดี-กลูโคส กลีเซลรอล และเพคติน (pectin) เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน แต่ไม่สามารถใช้แอล-อะราบิโนส (L-arabinose) ดี-ไซโลส (D-xylose) ดี-ฟรุกโตส (D-frutose) ดี-กาแลคโตส (D-galactose) มอลโตส (maltose) ซูโครส (sucrose) แลกโตส (lactose) ทรีฮาโลส (trehalose) ดี-ซอร์บิทอล (D-sorbitol) ดี-แมนนิทอล (D-mannitol) อินนอซิทอล (inositol) กลีเซลรอล (glycerol) แป้ง กรดซิตริก (citric acid) กรดแลคติก (lactic acid) เมทิลลามีน (methylamime) มีเทน (methane) หรือไฮโดรเจน บางสายพันธุ์ใช้ ดี-แมนโนส (D-mannose) ได้เล็กน้อย ต้องการแคลเซียม แพนโททีเนต (calcium pantothenate) ในการเจริญ สามารถเจริญในช่วงพีเอช 3.0-5.0 ไม่สามารถเจริญที่พีเอชสูงกว่า 6.0 หรือต่ำกว่า 1.5 อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญ คือ 30 และ 37 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส และไม่เจริญในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือ 3 เปอร์เซ็นต์

4 *Gluconacetobacter* (Yamada *et al.,* 1997)

Gluconacetobacter เป็นแบคทีเรียอะซิติก ติดสีแกรมลบ มีลักษณะเป็นรูปท่อน พบเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นสาย หรือเป็นกลุ่มเล็ก มี peritrichously flagellated เคลื่อนที่ได้ โคโลนีมีลักษณะนูน เรียบ ออกซิไดซ์ อะซิเตทและแลกเตท ให้คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ เจริญบนแมนนิทอล อะการ์ มียูบิควิโนน-10 เช่นเดียวกับสกุล *Gluconobacter* มีการผลิตกรดจาก ดี- กลูโคส(D-glucose), ดี-แมนโนส (D-manaose), ดี-ไซโลส (D-xylose) และเอทานอล (Ethanol) ผลิต 5- คีโต กลูโคเนต (5-keto-D-gluconate) และ 2–คีโต กลูโคเนต (2-keto-Dgluconate) จาก ดี-กลูโคส(D-glucose) และ ไดไฮดรอกซีอะซิโตน(dihydroxyacetone) จากกลีเซอรอล มี G+C content ในอัตรา 54.9 – 66.4 mol% แบคทีเรียสกุลนี้มีลักษณะคล้ายกับ *Acetobacter* คือสามารถออกซิไดซ์อะซิเตทและแลกเตทไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ ได้ปัจจุบันประกอบด้วยสมาชิก 13 สายพันธุ์ได้แก่ *Gluconacetobacter sacchari, Ga. liquefaciens, Ga. diazotrophicus, Ga. azotocaptans, Ga. johannae, Ga. hansenii, Ga. entanii , Ga. rhaeticus, Ga. oboediens, Ga. intermedius, Ga. xylinus, Ga. europaeus, Ga. swingsii* (Yamada *et al.,* 1997,1998 : Dellaglio *et al.,* 2005 :Lisdiyanti *et al*., 2006)

5 *Asaia* (Yamada *et al.,* 2000)

Asaia มีลักษณะแตกต่างจากแบคทีเรียอะซิติกตัวอื่นๆ เนื่องจากไม่สามารถผลิตกรดหรือผลิตอะซิติกได้น้อย สกุล *Asaia* แบ่งออกเป็น 3 สายพันธุ์ คือ *Asaia bogorensis* (Yamada *et al.,* 2000) และ *As. siamensis* (katsura *et al.,* 2001) และ *As. krunkthepensis* (Yukphan *et al*., 2004) มีทั้งสายพันธุ์ที่เคลื่อนที่ได้และเคลื่อนที่ไม่ได้ สายพันธุ์ที่เคลื่อนที่ได้จะมีแฟลกเจลลาแบบรอบเซลล์ สามารถเจริญได้ในอาหารทดสอบที่มีความเป็นกรด-ด่าง 3.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และสามารถเจริญในสภาวะที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ได้ แต่ถูกยับยั้งการเจริญในอาหารทดสอบที่มีกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.35 เปอร์เซ็นต์ ไม่สามารถเจริญในอาหารที่มีเฉพาะเมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอน สามารถผลิตไดไฮดรอกซีอะซีโตน (dihydroxyacetone) จากกลีเซอรอลได้น้อยมาก สามารถผลิตกรด 2-คีโตกลูโคนิก (2-ketogluconic-acid) และกรด 5-คีโตกลูโคนิก (5-ketogluconic-acid) แต่ไม่สามารถผลิตกรด 2,5 ไดคีโตกลูโคนิค (2,5-diketogluconic-acid) จากน้ำตาลดี- กลูโคส ผลิตกรดจากน้ำตาล ดี-กลูโคส(D-glucose) ดี-แมนโนส (D-mannose) ดี-ฟลุกโตส (D-fructose) แอล-ซอร์โบส (L-sorbose) ไรบิทอล (ribitol) กลีเซอรอล (glycerol) และเมลลิไบโอส (melibiose) แต่ไม่สามารถผลิตกรดจากน้ำตาลแลคโตส และมอลโตส *Asaia bogorensis* สามารถผลิตกรดจากน้ำตาลดอลซิทอล (dulcitol) ได้ แต่ *As. siamensis* ไม่สามารถผลิตกรดจากน้ำตาลดอลซิทอล (dulcitol) ได้ และ มี ยูบิควิโนน 10 (Ubiquinol Q-10) เป็นยูบิควิโนนหลัก

6 *Kozakia* (Lisdiyanti *et al.,* 2002)

Kozakia เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน เซลล์ไม่เคลื่อนที่ ขนาด 2.0-3.0 ไมโครเมตร เจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนเท่านั้น (strictly aerobic) ให้ผลการทดสอบคะตะเลสเป็นบวก และให้ผลการทดสอบออกซิเดสเป็นลบ ไม่สร้างรงควัตถุสีน้ำตาลที่ละลายน้ำจากน้ำตาลดี-กลูโคส ไม่สามารถย่อยสลายเจลลาติน ไม่มีการผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ (hydrogensulfide ; H_2S) ให้ผลการทดสอบอินโดล และการรีดิวส์ไนเตรทเป็นลบ สามารถออกซิไดซ์อะซิเตท และแลคเตทไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำได้ แต่จะเกิดปฏิกิริยาช้ามาก ผลิตกรดอะซิติกจากเอทานอล กรดอะซิติกความเข้มข้น 0.35 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ สามารถเจริญบนอาหารแมนนิทอล

อะการ์ (mannitol agar) แต่ไม่สามารถเจริญบนอาหารกลูตาเมท อะการ์ (glutamate agar) ไม่สามารถเจริญในสภาวะที่มีน้ำตาลกลูโคส 30 เปอร์เซ็นต์ได้ ไม่ใช้เมทานอลผลิตไดไฮดรอกซีอะซิโตนจากกลีเซอรอล ผลิตดี-กลูโคเนต (D-gluconate) 2-คีโต-ดี-กลูโคเนต (2-keto-D-gluconate) และ 5-คีโต-ดี-กลูโคเนต(5-keto-D-gluconate) จากน้ำตาลดี-กลูโคเนต แต่ไม่สร้าง 2,5-ไดคีโต-ดี-กลูโคส (2,5diketo-D-glucose) ผลิตกรดจากแอล-อะราบิโนส (L-arabinose) ดี-ไซโลส (D-xylose) ดี-กลูโคส (D-glucose) ดี-กาแลคโตส (D-galacttose) ดี-แมนโนส (D-mannose) เมลลิไบโอส (melibiose) ราฟฟิโนส (raffinose) มีโซ-อิริทริตอล (meso-etrythritol) กลีเซอรอล (glycerol)และเมทานอลแต่ไม่ผลิตกรดจาก แอล-แรมโนส (L-rhamnose) ดี-ฟลุกโตส (D-fructose) แอล-ซอร์โบส (L-sorbose) แลคโตส (lactose) ดี-แมนนิทอล (D-mannitol) ดี-ซอร์บิทอล (D-sorbitol) ดอลซิทอล (dulcitol) การผลิตกรดจากน้ำตาล ดี-อะราบิโนสและน้ำตาลจากซูโครสแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ของเชื้อสกุล *Kozakia* มียูบิควิโนน 10 (Ubiquinol Q-10) เป็นยูบิควิโนนหลัก มีเพียงหนึ่งสายพันธุ์คือ *Kozakia baliensis*

7 *Swaminathania* (Loganathan and Nair, 2004)

Swaminathania เป็นแบคทีเรียแกรมลบ เซลล์รูปร่างเป็นแท่งจนถึงกลม ขนาดของเซลล์ 0.7-0.9 x 1.9-3.1 ไมโครเมตร มีแฟลกเจลลารอบเซลล์ ผลทดสอบการสร้างเอนไซม์ออกซิเดสเป็นลบ แต่ คะตะเลส เป็นบวก สามารถออกซิไดส์เอทานอลกับอะซิติกในสภาวะเป็นกลางได้ และสามารถออกซิไดซ์ อะซิเตทและแลคเตทไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำได้ สร้างเม็ดสีสีน้ำตาลที่ละลายน้ำได้บนอาหาร GYC agar medium ไม่สามารถไฮโดรไลส์เจลลาตินและแป้งได้ เจริญได้ดีในกรดอะซิติกความเข้มข้นร้อยละ 0.35 เจริญได้ในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 3 และโพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3) ความเข้มข้นร้อยละ 1 สามารถผลิตกรดจาก แอล-อะราบิโนส (L-arabinose) ดี-กลูโคส (D-glucose) กลีเซอรอล (glycerol) เอทานอล (ethanol) ดี-แมนโนส (D-mannose) ดี-กาแลคโตส (D-galacttose) และอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบของซอร์บิทอล และมียูบิควิโนน-10 (Q-10) เป็นยูบิควิโนนหลัก ส่วนประกอบของ DNA base มี G+C content 57.6-59.9 โมลเปอร์เซ็นต์

8 *Saccharibacter* (Jogima *et al*., 2004)

Saccharibacter เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ไม่เคลื่อนที่ เซลล์รูปร่างเป็นแท่ง ขนาดของเซลล์ 0.8-1.0 x 2.5-4.0 ไมโครเมตร สร้างเอนไซม์คะตะเลสให้ผลเป็นบวก ไม่สร้างเอนไซม์ ออกซิเดส ไม่พบการสร้างเม็ดสี ไม่สร้างเมือกและเซลลูโลส ความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญประมาณ 5.0-7.0 ไม่สามารถเจริญได้ในสภาวะความเป็นกรด-ด่างต่ำกว่า 4.0 หรือมากกว่า 8.0 และสามารถเจริญได้ในสภาวะมีกลูโคสร้อยละ 2-40 เจริญได้ในอาหารที่มีกลูตาเมทมากถึงร้อยละ 7 และสามารถเจริญบนแมนนิทอล อาการ์ แต่ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีกลูตาเมทร้อยละ 1 ผลิตกรดกลูโคนิค (gluconic acid) 2-คีโต-ดี-กลูโคนิค (2-keto-D-gluconic acid) และ 5-คีโต-ดี-กลูโคนิค (5-keto-D-gluconic acid) จากกลูโคส และเจริญได้ดีมากถ้าความเข้มข้นกลูโคสสูง สามารถออกซิไดซ์อะซิเตทและแลคเตทไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำได้ ไม่สามารถใช้เมทานอลได้ ไม่ผลิตไดไฮดรอกซีอะซีโตน (dihydroxyacetone) แต่ผลิตกรดจากแอล-อะราบิโนส (L-arabinose) ดี-ไซโลส (D-xylose) ดี-กาแลคโตส (D-galacttose) การผลิตกรดจากแอลซอร์โบส (L-sorbose) บางครั้งอาจเปลี่ยนแปลงได้ และมียูบิควิโนน-10 (Q-10) ส่วนประกอบของ DNA base มี G+C content อยู่ในช่วง 52-53 โมลเปอร์เซ็นต์

9 *Neoasaia* (Yukphan, 2005)

Neoasaia เป็นสายพันธุ์ในกลุ่มของแบคทีเรียอะซิติกใน α-proteobacteria *Neoasaia chiangmaiensis* เป็นแบคทีเรียที่ค้นพบในประเทศไทยจากจังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งแบคทีเรียสายพันธุ์นี้คัดแยกได้จากดอกไม้ที่มีสีน้ำตาลออกเหลือง เจริญได้ที่ความเป็นกรด-ด่าง 3.5 โดยใช้อาหารที่มีองค์ประกอบของกลูโคสร้อยละ 0.3 เอทานอล และกรดอะซิติก ผลการทดสอบทางพันธุกรรมพบว่ามีความใกล้ชิดกับ *Kozakia* โดยใช้การวิเคราะห์ในส่วนของ 16S rDNA ลักษณะเฉพาะของเซลล์คือ ไม่เคลื่อนที่ โคโลนีสีชมพู กลมนูน ขอบเรียบ สร้างเม็ดสีสีน้ำตาล (brown pigment) ได้ สามารถผลิตกรดอะซิติกจากเอทานอลได้ สำหรับการออกซิเดชันของอะซิเตท และแลกเตทให้ผลเป็นลบเหมือนกับ *Gluconobacter* เจริญได้ในอาหารกลูตาเมท อะการ์ (glutamate agar) แมนนิทอล อะการ์ (mannitol agar) และในดี-กลูโคส ร้อยละ 30 (30% D-glucose) เจริญได้ดีในกรดอะซิติกร้อยละ 0.35 แต่ไม่เจริญในโพแทสเซียมไนเตรทร้อยละ 0.1 (KNO_3) สามารถผลิตไดไฮดรอกซีอะซีโตน (dihydroxyacetone) จากกลีเซอรอล แต่ไม่ผลิตโพลีแซคคาไรด์ที่มีโครงสร้างคล้ายลีแวน (leven-like polysaccharide) บนอาหารซูโครส (sucrose medium) มียูบิควิโนน 10 (Ubiquinol Q-10) เป็นยูบิควิโนนหลัก ส่วนประกอบของ DNA base มี G+C content 63.1 โมลเปอร์เซ็นต์

10 *Granulibacter* (Green berg *et al*., 2006)

Granulibacter เป็นแบคทีเรียแกรมลบ พวก aerobic มีรูปร่างแบบแท่งจนถึงกลม เป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากผู้ป่วย chronic granulomatous disease (CGD) เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส และช่วงความเป็นกรด-ด่าง 5.0-6.5 สร้างเม็ดสีสีเหลือง (yellow pigment) การทดสอบสามารถออกซิไดซ์อะซิเตท และแลกเตทให้ผลเป็นบวกแต่อะซิเตทสามารถออกซิไดซ์ได้ช้ากว่า ผลิตกรดอะซิติกได้เล็กน้อยจากเอทานอล และอาจจะสามารถใช้เมทานอลเป็นแหล่งพลังงานได้ มียูบิควิโนน 10 (Q-10) เป็นยูบิควิโนนหลัก ส่วนประกอบของ DNA base มี G+C content 63.1 โมลเปอร์เซ็นต์

11 *Tanticharoenia* (Yukphan *et al*., 2008)

Tanticharoenia เป็นแบคทีเรียอะซิติกที่ทนแรงดันออสโมติกได้สามารถเจริญได้ใน อาหารที่มีความเข้มข้นของกลูโคสสูงถึงร้อยละ 30 มีรูปร่างเป็นท่อนติดสีแกรมลบ ไม่เคลื่อนที่ มีขนาด 0.6-0.8x1.0-1.6 ไมโครเมตร โคโลนีมีสีครีม มีลักษณะเรียบ ขอบเรียบ ไม่สามารถออกซิไดซ์อะซิเตทและแลคเตท ผลิตรงควัตถุสีน้ำตาลที่ละลายน้ำไม่สามารถใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอน มียูบิควิโนน 10 เป็น ยูบิควิโนนหลัก ส่วนประกอบของ DNA base มี G+C content 64.5-65.6 โมลเปอร์เซ็นต์

12 *Amayamaea* (Yukphan *et al*., 2009)

Ameyamaea เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปท่อน เคลื่อนที่ได้ด้วยเฟลกเจลลาที่ขั้ว มีขนาดของเซลล์ 0.6-0.8x1.0-1.8 ไมโครเมตร โคโลนีมีสีครีม มีลักษณะเรียบ ขอบเรียบ เมื่อเจริญบนกลูโคส-เอทานอล-แคลเซียมคาร์บอเนต อาการ์ ออกซิไดซ์อะซิเตทได้แรง แต่ออกซิไดซ์แลกเตทได้อ่อน เจริญบนอาหารวุ้นกลูตาเมตได้เล็กน้อย ไม่สามารถเจริญบนอาหารที่มีกลูโคสร้อยละ 30 เจริญบนอาหารที่มีเมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนได้เล็กน้อย ไม่ผลิตรงควัตถุสีน้ำตาล มียูบิควิโนน 10 เป็น ยูบิควิโนนหลัก ส่วนประกอบของ DNA base มี G+C content 66.0-66.1 โมลเปอร์เซนต์

2.3.2.3 แบคทีเรียอะซิติกที่พบในกระบวนการผลิตคอมบูชา

ได้แก่ *Acetobacter xylinoides, A. pasteurianus, A. xylinum, A. aceti*, และ *Bacterium gluconicum* (Chen and Liu, 2000; Fu *et al.,* 2014)

ตารางที่ 2.1 ลักษณะที่แตกต่างกันของสกุล *Acetobacter, Gluconobacter, Acidomonas, Gluconacetobacter* และ *Asaia*

ลักษณะ	*Acetobacter*	*Gluconobacter*	*Acidomonas*	*Gluconacetobacter*	*Asaia*
Flagellation	Peritri chous or non- motile	Polar or non-motile	Motile or non-motile	Peritri chous or non-motile	Peritri chous or non-motile
Pigmentation	-	+	-	-	+ or -
Production of water soluble brown pigment(s)	-	+ or -	-	+ or -	-
Production of cellulose	-	-	-	+ or -	-
Production of mucous substance(s) from sucrose	+ or -	-	-	+	-
Oxidation of Acetate	+	-	+	+	w
Oxidation of Lactate	+	-	-	+	w
Production of acetic acid from ethanol	+	+	+	+	-
Growth in present of 0.3%(v/v) acetic acid in CaCO3-free AG broth at pH 3.5	+	+	+	+	-
Growth in the present of 30% D-glucose	-	-	nd	+ or -	+
Growth on D-manital	w	+	nd	+	+
Growth on glutamate agar	+	-	nd	+	+
Assimilation of ammonium Nitrogen on Hoyer-Frateur medium					
D-glucose	-	+	nd	+ or -	+
D-mannitol	-	+	nd	+ or -	+
Ethanol	+ or -	-	nd	-	-
Utilization of methanol	-	-	+	-	-
Ketogemesis from glycerol	+ or -	+	-	+ or -	+ or -
Production of keto-D-gluconates from D-glucose					
2-keto-D-gluconate	+ or -	+	-	+	+
5-keto-D-gluconate	+ or -	+	-	+ or -	+

หมายเหตุ : + : ผลบวก, - : ผลลบ, w : ปฏิกิริยาอ่อนมาก, nd : ไม่ได้ทำการทดสอบ

ตารางที่ 2.1 (ต่อ) ลักษณะที่แตกต่างกันของสกุล *Acetobacter, Gluconobacter, Acidomonas, Gluconacetobacter* และ *Asaia*

ลักษณะ	*Acetobacter*	*Gluconobacter*	*Acidomonas*	*Gluconacetobacter*	*Asaia*
Production of keto-D-gluconates from					
D-glucose					
2,5-diketo-D-gluconate	-	+ or -	-	+ or -	-
Acid production					
L-arabinose	+ or -	+	+	+ or -	+
D-arabinose	-	+	+	-	+
D-Xylose	+ or -	+	+	+ or -	+
L-rhamnose	-	-	-	-	+ or -
D-glucose	+ or -	+	+	+	+
D-galactose	+ or -	+	+	+	+
D-mannose	+ or -	+	+	+ or -	+
D-fructose	-	+	-	+	+
L-sorbose	-	+	nd	+ or -	+
Melibiose	-	+	+	-	+
Sucrose	-	+	-	-	+
Raffinose	-	-	nd	-	-
D-mannitol	-	+	-	+ or -	+ or -
D-sorbitol	-	+	-	-	+ or -
Dulcitol	-	-	-	-	+
Glycerol	-	+	+	+	+
Ethanol	+	+	+	+	-
G+C content (mol %)	Q-9	Q-10	Q-10	Q-10	Q-10
Major ubiquinone	52-60	51-63	63-66	55-66	59-61

หมายเหตุ : + : ผลบวก, - : ผลลบ, w : ปฏิกิริยาอ่อนมาก, nd : ไม่ได้ทำการทดสอบ

ที่มา : Lisdiyanti *et al*., (2004) : Yukphan, (2004) : Yamashita, (2004) : Loganathan and Nair,(2004) : Yukphan *et al* ., (2006)

ตารางที่ 2.2 ลักษณะที่แตกต่างของสกุล *Kozakia, Swaminathania, Saccharibacter, Neoasaia* และ *Granulibacter*

ลักษณะ	*Kozakia*	*Swaminathania*	*Saccharibacter*	*Neoasaia*	*Granulibacter*
Flagellation	Non-motile	Non-motile	Non-motile	Non-motile	Non-motile
Pigmentation	-	nd	nd	nd	+
Production of water soluble brown pigment(s)	-	+	-	-	nd
Production of cellulose	-	nd	nd	nd	nd
Production of mucous substance(s) from sucrose	+	nd	nd	nd	nd
Oxidation of Acetate	w	w	-	-	w
Oxidation of Lactate	w	w	w	-	+
Production of acetic acid from ethanol	+	+	w/-	+	nd
Growth in present of 0.3%(v/v) acetic acid in CaCO3-free AG broth at pH 3.5	+	+	-	+	nd
Growth in the present of 30% D-glucose	-	-	+	nd	nd
Growth on D-manital	+	nd	nd	+	w
Growth on glutamate agar	-	+	+	+	+
Assimilation of ammonium Nitrogen on Hoyer-Frateur medium					
D-glucose	+ or -	nd	-	-	nd
D-mannitol	+	nd	-	w	nd
Ethanol	-	nd	-	-	nd
Utilization of methanol	-	nd	nd	nd	+
Ketogemesis from glycerol	+	nd	nd	nd	nd
Production of keto-D-gluconates from D-glucose					
2-keto-D-gluconate	+	nd	nd	nd	nd
5-keto-D-gluconate	+	nd	nd	nd	nd

หมายเหตุ : + : ผลบวก, - : ผลลบ, w : ปฏิกิริยาอ่อนมาก, nd : ไม่ได้ทำการทดสอบ

ที่มา : Lisdiyanti *et al*., (2004) : Yukphan, (2004) : Yamashita, (2004) : Loganathan and Nair, (2004) : Yukphan *et al* ., (2006)

ตารางที่ 2.2 (ต่อ) ลักษณะที่แตกต่างของสกุล *Kozakia, Swaminathania, Saccharibacter, Neoasaia* และ *Granulibacter*

ลักษณะ	*Kozakia*	*Swaminathania*	*Saccharibacter*	*Neoasaia*	*Granulibacter*
Production of keto-D-gluconates from D-glucose					
2,5-diketo-D-gluconate	-	nd	nd	nd	nd
Acid production					
L-arabinose	+	nd	nd	nd	nd
D-arabinose	+ or -	nd	-	w	nd
D-Xylose	+	w	+	+	-
L-rhamnose	-	-	-	W	nd
D-glucose	+	nd	nd	+	+
D-galactose	+	nd	nd	nd	nd
D-mannose	+	nd	nd	nd	nd
D-fructose	-	w	nd	+	nd
L-sorbose	-	nd	-	-	nd
Melibiose	+	nd	+	+	nd
Sucrose	+ or -	nd	+	+	-
Raffinose	+	nd	-	+	nd
D-mannitol	-	-	+	W	-
D-sorbitol	-	+	-	+	-
Dulcitol	-	w	-	W	nd
Glycerol	+	+	-	+	+
Ethanol	+	+	-	+-	+
G+C content (mol %)	Q-10	Q-10	Q-10	Q-10	Q-10
Major ubiquinone	56-57	57.6-59-9	52.3	63.1	59

หมายเหตุ : + : ผลบวก, - : ผลลบ, w : ปฏิกิริยาอ่อนมาก, nd : ไม่ได้ทำการทดสอบ

ที่มา : Lisdiyanti *et al*., (2004) : Yukphan, (2004) : Yamashita, (2004) : Loganathan and Nair, (2004) : Yukphan *et al* ., (2006)

2.4 ชา

ปัจจุบันมีการค้นพบและมีรายงานทางวิทยาศาสตร์ที่แสดงถึงประโยชน์ที่ได้รับจากการดื่มชา ทำให้ผู้บริโภคให้ความสนใจและบริโภคชาเพิ่มขึ้น ชามีสารประกอบโพลิฟีนอลที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ สมบัติการต้านอนุมูลอิสระทำให้โพลิฟีนอลในชามีประโยชน์ต่อสุขภาพที่หลากหลาย เช่น ช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งในอวัยวะต่างๆ (Yuan *et al*., 2011) ลดความเสี่ยงในการเกิดโรคหัวใจและโรคหลอดเลือด (Deka and Vita, 2011) ช่วยควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดของผู้ป่วยโรคเบาหวาน (Shoji and Nakashima, 2006) และช่วยลดความอ้วน (Rains *et al*.,2011) ชนิดและปริมาณของสารประกอบโพลิฟีนอลในชาจะแตกต่างกันไปตามปัจจัยต่างๆ ได้แก่ สายพันธุ์ชา ฤดูการเก็บเกี่ยว สภาพภูมิอากาศ ความอุดมสมบูรณ์ของดิน การจัดการหลังการเก็บเกี่ยว และกระบวนการผลิตชา (Fernandez *et al*., 2002) กระบวนการผลิตชาถือได้ว่าเป็นส่วนสำคัญที่สุดที่ส่งผลต่อชนิดและปริมาณของสารประกอบโพลิฟีนอลในชา เนื่องจากกระบวนการผลิตที่แตกต่างกันส่งผลต่อปฏิกิริยาเคมี และชีวเคมีในใบชา ทำให้สารประกอบโพลิฟีนอลเกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งชนิดและปริมาณ ส่งผลให้ชาแต่ละประเภทมีสี กลิ่น และรสชาติที่แตกต่างกันไป

องค์ประกอบเคมีในใบชาสด

ชาที่ผลิตทางการค้าส่วนใหญ่มาจาก 2 สายพันธุ์ คือ *Camellia sinensis* var. *sinensis* (ชาจีน) และ *Camellia sinensis* var. *assamica* (ชาอัสสัม) การเก็บใบชาสดที่มีคุณภาพ เพื่อนำมาเข้ากระบวนการผลิตจะใช้แรงงานคนในการเก็บ โดยเลือกเก็บเฉพาะยอดชาที่ตูมและใบที่ต่ำจากยอดตูมลงมา 2-3 ใบ องค์ประกอบในใบชาสดประกอบด้วยกลุ่มของสารประกอบ 6 กลุ่มคือ flavanols, hydroxy-4-flavonols, anthocyanins, flavones, flavonols และ phenolic acids โดยฟลาวานอล (flavanols) เป็นองค์ประกอบที่พบมากที่สุด (60 - 80% ของโพลิฟีนอล) เรียกว่าคาเทชิน (catechins)

กระบวนการผลิตชา

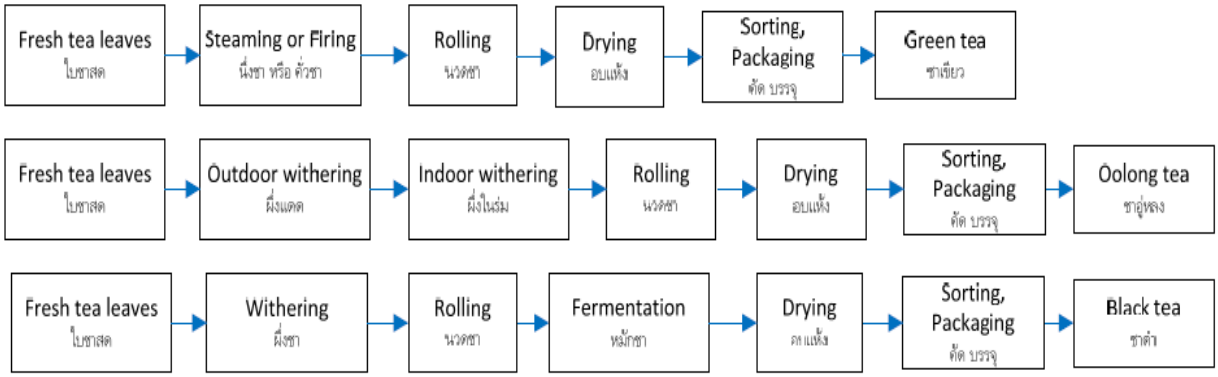
ชาทุกชนิดผลิตมาจากยอด และใบอ่อนของต้นชา เมื่อแบ่งตามกระบวนการผลิตสามารถแบ่งได้ 3 ประเภทใหญ่ๆ คือ ชาเขียว ชาอู่หลง และชาดำ (รูปที่ 2.7)

1. ชาเขียว (Green tea) เป็นชาที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก (non-fermented tea) วิธีการผลิตเริ่มจากอบใบชาสดด้วยไอน้ำ หรือคั่วบนกระทะร้อน เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์โพลิฟีนอลออกซิเดส (polyphenoloxidase, PPO) ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของคาเทชิน จึงไม่เกิดการหมักจากนั้นนำไปนวดให้เป็นเส้น และนำไปอบแห้ง ตามด้วยการคัดเกรดและบรรจุ

2. ชาอู่หลง (Oolong tea) เป็นชาที่ผ่านกระบวนการหมักเพียงบางส่วน (partially fermented tea) วิธีการผลิตเริ่มจากตากชา ประมาณ 20 - 40 นาที โดยการผึ่งแดด ต่อมาจะนำใบชามาผึ่งในร่มพร้อมเขย่ากระตุ้นเพื่อให้ใบชาช้ำในบริเวณขอบใบ การผึ่งในร่ม และเขย่าให้ใบชาช้ำทำให้เกิดการหมักเพียงบางส่วนที่ทำให้เอนไซม์โพลิฟีนอลออกซิเดสเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของคาเทชิน เกิดการรวมตัวกันของคาเทชินเป็นสารประกอบใหม่ ทำให้ชาอู่หลงมีสี กลิ่น และรสชาติที่ต่างไปจากชาเขียว จากนั้นนำไปนวด ขึ้นรูปให้เป็นเม็ด และนำไปอบแห้ง ตามด้วยการคัดเกรด และบรรจุ

3. ชาดำ (Black tea) เป็นชาที่ผ่านกระบวนการหมักอย่างสมบูรณ์ (completely fermented tea) ใบชาสดจะถูกผึ่งเพื่อลดความชื้น ตามด้วยนวดหรือตีป่น จากนั้นเป็นกระบวนการหมักที่ปล่อยให้เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันคาเทชินอย่างสมบูรณ์ คาเทชินจะเกิดออกซิเดชัน และ

รวมตัวกันเป็นสารประกอบใหม่ที่มีสีเข้มขึ้นกว่าชาอู่หลง และชาเขียว จากนั้นอบแห้ง ตามด้วยการคัดเกรด และบรรจุ



รูปที่ 2.5 กระบวนการผลิตชาเขียว ชาอู่หลง และชาดำ
ที่มา : ธีรพงษ์ เทพกรณ์ (2550)

2.5 ปฏิกิริยาของคอมบูชา

การหมักของแบคทีเรีย และยีสต์เป็นแบบพึ่งพากันในลักษณะเอื้อประโยชน์ต่อกันหรือเรียกว่า stable symbiosis โดยเกิดขึ้นภายใต้บริเวณโครงสร้างที่มีลักษณะเป็นร่างแหเซลลูโลส กิจกรรมการหมักในระยะแรกยีสต์ทำหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาลซูโครสให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว คือ กลูโคส และฟรุกโตส จากนั้นก็จะเปลี่ยนน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวให้เป็นแอลกอฮอล์ ทำให้สภาวะดังกล่าวมีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกลุ่มแบคทีเรีย *Acetobacter* ที่สามารถเจริญได้ดีพร้อมทั้งผลิตกรดอะซิติก โดยเฉพาะการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Acetobacter xylinum* ที่สามารถให้ทั้งผลผลิตของกรดอะซิติก กรดกลูโคนิค และเซลลูโลส ทำให้ชาหมักที่ได้มีคุณภาพดี ขณะเดียวกันก็จะส่งผลต่อการเร่งการเจริญเติบโตของยีสต์ และทำให้ยีสต์ผลิตแอลกอฮอล์ได้มากขึ้น ปริมาณแอลกอฮอล์ที่เพิ่มขึ้นยังสามารถช่วยกระตุ้นให้ *Acetobacter* เจริญ และผลิตกรดอะซิติกได้ดีขึ้น กรดที่พบในชาหมัก ได้แก่ อะซิติก แลคติก และกลูโคนิค ผลดีของกรดอะซิติก และแอลกอฮอล์ที่มีอยู่ในชาหมักคือ มีคุณสมบัติช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค เช่น *Vibrio parahaemolyticus, Salmonella* Typhimurium, *E.coli, Pseudomonas aeruginosa, Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* และ *Listeria monocytogenes* (Battikh *et al.*, 2011)

กระบวนการหมักเพื่อให้ได้กรดอะซิติก เป็นปฏิกิริยา 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนการเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอทิลแอลกอฮอล์และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน โดยยีสต์ที่มีอยู่ในวัตถุดิบที่ใช้ในกระบวนการหมัก ในระยะแรกจะเป็นการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ เขียนเป็นสมการได้ ดังนี้ (ดุษณี, 2555)

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

ระยะที่สองเป็นปฏิกิริยาออกซิไดส์เอทิลแอลกอฮอล์ให้เป็นกรดอะซิติกโดยเชื้อแบคทีเรีย ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน โดยสามารถเขียนเป็นสมการได้ดังนี้

C_2H_5OH + O_2 ⟶ CH_3COOH + H_2O

เอทิลแอลกอฮอล์ ออกซิเจน กรดอะซิติก น้ำ

2.6 ประโยชน์ของคอมบูชา

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

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

2.7 อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ

2.7.1 อนุมูลอิสระ (free radicals)

อนุมูลอิสระ (free radicals) หมายถึง สารที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว (unpaired electrons) ในอะตอมหรือโมเลกุล พบได้ทุกแห่งทั้งในสิ่งแวดล้อม ในสิ่งมีชีวิต และในเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกระบวนการผลิตพลังงานภายในเซลล์ หรือจากกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) โดยมีการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนออกจากโมเลกุลของออกซิเจน ทำให้อิเล็กตรอนในโมเลกุลออกซิเจนไม่สมดุล กลายเป็นอนุมูลอิสระ และว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยา และสามารถดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นมาแทนที่อิเล็กตรอนที่ขาดหายไปเพื่อให้ตัวเองเกิดความสมดุลหรือเสถียร ซึ่งปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ และเกิดขึ้นในเซลล์ตลอดเวลา (ดังสมการ 1 และ 2)

$R^{\bullet} + O_2 \longrightarrow ROO\bullet$ .....สมการ 1

$ROO^{\bullet} + RH \longrightarrow ROOH + R^{\bullet}$ .....สมการ 2

อนุมูลอิสระที่สำคัญที่สุดที่เกิดในเซลล์ที่ใช้ออกซิเจน ได้แก่ oxygen radical, อนุพันธ์ของ oxygen radical (เช่น superoxide radical และ hydroxyl radical), hydrogen peroxide, transition metals (โลหะทรานซิชัน), carbonate radical ($CO_3^{\bullet}$-), nitrate radical($NO_3^{\bullet}$), methyl radical ($CH_3^{\bullet}$), superoxide radical($O_2^{\bullet}$), peroxyl radical ($ROO^{\bullet}$), reactive oxygen species (ROS) เป็นต้น (Halliwell, 1999) นอกจากนี้อนุมูลอิสระสามารถทำลายชีวโมเลกุลทุกประเภท ทั้งในเซลล์และส่วนประกอบของเซลล์สิ่งมีชีวิต เช่น ไขมัน โปรตีน เอนไซม์ ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ คาร์โบไฮเดต เซลล์ และไมโตคอนเดรีย ซึ่งเป็นสาเหตุให้เซลล์ตาย การเกิดการกลายพันธุ์ของดีเอ็นเอในเซลล์ และก่อให้เกิดโรคต่าง ๆ ได้แก่ โรคชรา โรคมะเร็ง โรคหัวใจขาดเลือด โรคความจำเสื่อม

โรคข้ออักเสบ โรคภูมิแพ้ โรคความดันโลหิต โรคเหงือก โรคเกี่ยวกับสายตา ความผิดปกติของปอด และระบบประสาท โรคเกี่ยวกับทางเดินหายใจ โรคเกี่ยวกับความผิดปกติของผิวหนัง และโรคลำไส้อักเสบ เป็นต้น (Ames *et al*.,1993) อนุมูลอิสระนอกจากจะเกิดภายในสิ่งมีชีวิตแล้วอนุมูลอิสระสามารถเกิดจากภายนอกสิ่งมีชีวิตหรือในสิ่งแวดล้อม ได้แก่ การได้รับเชื้อโรค เช่น การติดเชื้อโรคไวรัสหรือเชื้อแบคทีเรีย โรคเกี่ยวกับภูมิคุ้มกัน เช่น ข้ออักเสบรูมาตอยด์ จากรังสี เช่น รังสีอัลตราไวโอเลต รังสีเอ็กซ์ รังสีแกมมา จากมลภาวะ เช่น ควันบุหรี่

2.7.2 สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants)

มีความสำคัญต่อกระบวนการออกซิไดซ์อนุมูลอิสระ หรือสามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยในสิ่งมีชีวิตจะมีระบบการป้องกันการทำลายเซลล์ และเนื้อเยื่อจากอนุมูลอิสระ ประกอบด้วยสารต้านอนุมูลอิสระมากมายหลายชนิดที่ทำหน้าที่แตกต่างกันไป ซึ่งมีทั้งที่เป็นเอนไซม์และไม่เป็นเอนไซม์ สารประกอบที่ละลายในน้ำ และสารประกอบที่ละลายในไขมัน โดยสารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้มีกลไกการทำงานต้านอนุมูลอิสระด้วยกันหลายแบบ เช่น ดักจับอนุมูลอิสระ (radical scavenging) การยับยั้งการทำงานของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน (singlet oxygen quenching) จับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ หยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ เสริมฤทธิ์ และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ เป็นต้น ตัวอย่างแสดงการดักจับอนุมูลอิสระดังสมการ 3 และ 4 (เจนจิรา และประสงค์, 2554)

$R^{\bullet} + AH \longrightarrow RH + A^{\bullet}$ .....สมการ 3

$RO^{\bullet} + AH \longrightarrow ROH + A^{\bullet}$.....สมการ 4

โดย $R^{\bullet}$ และ $RO^{\bullet}$ คือ อนุมูลอิสระ และ AH คือ สารต้านอนุมูลอิสระ แหล่งที่มาของสารต้านอนุมูลอิสระมี 2 แหล่ง ได้แก่ สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ และสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์เกิดจากการกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี โดยเป็นสารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ propylgallate, 2-butylated hydroxyanisole, 3-butylate hydroxyanisole, BHT (butylated hydroxy toluene) และ tertiary butyl hydroquinone สารสังเคราะห์ดังกล่าวนิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันที่เป็นสาเหตุทำให้อาหารมีกลิ่น สี และรสชาติเปลี่ยนแปลงไป สารสังเคราะห์นี้มีสภาพคงตัวกว่าสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ แต่มีข้อจำกัดในด้านความปลอดภัยในการบริโภค (Pokorny *et al*., 2001) ขณะที่สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติสามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตทั้งพืชและสัตว์ ซึ่งเป็นได้ทั้งเอนไซม์ วิตามินและสารอื่นๆ ตัวอย่างของสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นวิตามิน เช่น วิตามินซี (เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ไซโตพลาซึม) วิตามินอี (เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่เมมเบรน) และ กลูตาไธโอน (เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ป้องกันอันตรายจากอนุมูลอิสระที่ไซโตพลาซึม และเมมเบรน) ส่วนสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นเอนไซม์ ได้แก่ glutathione peroxidase, glutathione reductase และ glutathione transferase ซึ่งทำหน้าที่ทำให้โมเลกุลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เป็นออกซิเจนและน้ำ ส่วนเอนไซม์ superoxid dismutase สามารถเปลี่ยนออกซิเจนเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ สารต้านอนุมูลอิสระอื่นๆ ได้แก่ carotenoids และ ubiquinones เป็นสารต้านอนุมูลอิสระสามารถป้องกันอนุมูลอิสระออกซิเจนทั้งภายในเซลล์ และภายนอกเซลล์ (บุหลัน และคณะ, 2553)

จากการศึกษาพบว่าอนุมูลอิสระบางชนิดนั้นไม่เป็นอันตราย และเซลล์เม็ดเลือดขาวใช้อนุมูลอิสระเหล่านี้ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส และเซลล์มะเร็ง แต่ถ้ามีอนุมูลอิสระมากเกินกว่าที่ร่างกายต้องการมาก ร่างกายของเราจะผลิตเอนไซม์บางชนิดซึ่งเป็นแอนตี้ออกซิแดนท์เป็นเอนไซม์เพื่อ

ป้องกันอนุมูลอิสระ แต่อย่างไรก็ตามพบว่าถึงแม้จะมีการสร้างเอนไซม์ที่เป็นแอนตี้ออกซิแดนท์ขึ้น ก็ไม่เพียงพอ ร่างกายยังต้องการแอนตี้ออกซิแดนท์จากสารอาหารต่างๆ วิธีที่ใช้ทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่นิยมได้แก่ 2, 2 - diphenyl - 1 - picryhydrazyl (DPPH) (Que *et al*, 2006), Ferric reducing antioxidant power (FRAP) (Alia, 2009)

2.7.3 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity determination)

วิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงคุณภาพ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณ ในแต่ละประเภทจะมีหลายวิธีด้วย ซึ่งแต่ละวิธีมีความจำเพาะแตกต่างกัน

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณ การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณเป็นการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างประเภทต่าง ๆ วิธีที่นิยม ได้แก่ การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช ($DPPH^{\bullet}$) วิธีการฟอกสีอนุมูลอิสระเอบีทีเอส ($ABTS^{\bullet+}$) และการวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านอนุมูลอิสระ (FRAP assay) ซึ่งวิธีการดังกล่าวข้างต้นจะมีการสร้างอนุมูลอิสระที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน และวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งหรือกำจัดอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างที่สนใจ โดยวัดปริมาณอนุมูลอิสระที่ลดลงหรือที่เหลือจากค่าการดูดกลืนแสง สารอนุมูลอิสระที่นิยมใช้ เช่น $ABTS^{\bullet+}$ และ$DPPH^{\bullet}$ การคำนวณหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระหาได้จากอัตราส่วนของการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างกับสารมาตรฐาน (เช่น trolox, vitamin C และ ferrous sulfate) หน่วยของการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเชิงปริมาณแสดงได้ 2 แบบ คือ

1 แบบปริมาณความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีในตัวอย่าง ซึ่งค่าตัวเลขสูงก็แสดงว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง

2 แบบปริมาณความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ทำให้สารอนุมูลอิสระลดลง 50 % (IC50, 50 % of inhibitory concentration) โดยค่าตัวเลขต่ำแสดงว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง ทั้งสองแบบสามารถแสดงหน่วยได้หลากหลาย ได้แก่ ไมโครโมลต่อมิลลิกรัม, มิลลิโมลต่อมิลลิกรัม, ไมโครโมลต่อมิลลิตร, มิลลิโมลต่อมิลลิลิตร เป็นต้น

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (diphenylpicryhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay)เป็นการทดสอบด้วยวิธีทางเคมีโดยใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระในที่นี้ก็คืออนุมูลอิสระ ดีพีพีเอช ($DPPH^{\bullet}$, diphenyl-picryhydrazyl radical) ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัว และมีสีม่วงสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดโดยใช้เครื่องสเปกโตโฟโตรมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร เมื่อ $DPPH^{\bullet}$ ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระที่ละลายด้วยเอทานอล จะทำให้สีม่วงจางลง ๆ จนเป็นสีเหลือง (ดังสมการ 5) ซึ่งก่อนนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงต้องตั้งทิ้งไว้ที่มืดเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาทำให้หาการต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่างได้จากการคำนวณสีที่จางลงของการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH สูตรคำนวณได้จากการนำค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงจากการใส่ตัวอย่างเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น (ก่อนใส่สารตัวอย่าง) ดังนี้

$DPPH^{\bullet} + AH \longrightarrow DPPH\text{-}H + A^{\bullet}$ .....สมการที่ 5

DPPH radical scavenging (%) = [(A0-As)/A0] x 100

โดย A0 = ค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้น

As = ค่าการดูดกลืนแสงหลังจากเติมสารตัวอย่าง

สารมาตรฐานที่ใช้ในการเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ คือ โทรล็อกซ์ (trolox, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchlorman-2-carboxylic acid) แสดงค่าเป็น TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) มีหน่วยเป็น มิลลิโมลต่อมิลลิกรัม หรือ ไมโครโมลต่อมิลลิกรัม ข้อดีของวิธีนี้ คือ ง่าย สะดวก และรวดเร็ว (พยุงศักดิ์ และ สุรศักดิ์, 2555) ส่วนข้อเสีย คือ DPPH$^{\bullet}$ ค่อนข้างเสถียร ไม่ไวต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกายจริง จึงทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ช้า ทำให้ค่าการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่วัดได้น้อยกว่าความเป็นจริง และต้องวัดในปฏิกิริยาที่เป็นแอลกอฮอล์ ซึ่งจะทำให้โปรตีนตกตะกอนจึงไม่สามารถวิเคราะห์ในตัวอย่างที่เป็นเลือดได้ (ปรียนันท์,2549) อีกทั้งสารปนเปื้อน และโลหะจะรบกวน(interfere) ซึ่งสามารถเป็นตัวรีดิวซ์แล้วทำให้สีของอนุมูลอิสระ DPPH จางลงได้เช่นกัน (Lee *et al*., 2008)

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปัญญา และ สกุณณี (2559) ศึกษาการพัฒนาผลิตภัณฑ์คอมบูชาจากชาดำโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์ คัดแยกแบคทีเรียอะซิติกจากหัวเชื้อคอมบูชาของโรงงาน และน้ำหมักผลไม้เพื่อใช้ผลิตคอมบูชาจากชาดำ ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา และชีวเคมี สามารถคัดแยกแบคทีเรียอะซิติกได้ 38 ไอโซเลท เมื่อตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา และชีวเคมี พบว่ามี 34 ไอโซเลตเป็นแบคทีเรียจีนัส *Acetobacter* sp. และ 4 ไอโซเลตเป็นแบคทีเรียจีนัส *Gluconacetobacter* sp. เมื่อทดสอบความสามารถในการผลิตกรด พบว่าไอโซเลต K3-13 สามารถผลิตกรดได้สูงสุด 7.44 g/L และสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีความเข้มข้นของเอทานอล และกรดอะซิติกสูงร้อยละ 8 และร้อยละ 4 เมื่อนำไอโซเลท K3-13 มาใช้ในการหมักชาดำเป็นเวลา 21 วัน พบว่าค่าพีเอช ลดลงเหลือ 2.54 ให้ปริมาณกรดสูง 18.08 กรัมต่อลิตร เมื่อวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกด้วยวิธี Folin-Ciocalteu Colorimetric method พบว่ามีปริมาณสูงสุด 43.98 ± 0.6 มิลลิกรัมกรดแกลลิคต่อมิลลิลิตร และวิเคราะห์กิจกรรมสารต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay พบว่า มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ 139.31 ± 1.2 มิลลิกรัมกรัมกรดแกลลิคต่อมิลลิลิตร

สนธิรัตน์ และคณะ (2559) ทำการคัดแยกแบคทีเรียอะซิติกจากคอมบูชาเพื่อใช้ในการเป็นหัวเชื้อคอมบูชา โดยคัดแยกจากหัวเชื้อคอมบูชาของโรงงานและน้ำผลไม้หมัก จากการคัดแยกได้ทั้งหมด 425 ไอโซเลท เมื่อนำมาทดสอบทางชีวเคมีและการหมัก พบว่าแบคทีเรีย 8 ไอโซเลต มีความสามารถในการผลิตกรดและเจริญได้ดีในเอทานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 จึงนำมาใช้ในการหมักคอมบูชาต่อไป

Kurtzman *et al*., (2001) ทำการแยกเชื้อยีสต์จากคอมบูชา ค้นพบยีสต์สปีชีส์ใหม่ คือ *Zygosaccharomyces kombuchaensis* sp. เมื่อนำมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยตำแหน่ง D1/D2 ของ 26S rDNA และวิเคราะห์ phylogenetic tree พบว่าใกล้เคียงกันกับ *Z. lentus* โดยเชื้อ *Z. kombuchaensis* ไม่สามารถแยกออกโดยการศึกษาทางลักษณะสรีรวิทยา แต่สามารถจำแนกได้จากความแตกต่างของบริเวณตัดจำเพาะที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ บริเวณ 18S-ITS1

Ahmud and Hussein (2010) ศึกษาการคัดแยกยีสต์จากคอมบูชาในประเทศซาอุดิอาระเบีย พบยีสต์ 5 ไอโซเลตได้แก่ *Candida guilliermondii, Candida colleculosa, Candida kefyr, Candida krusei* and *Saccharomycodes ludwigi.*

Wang *et al*., (2010) ทำการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากหัวเชื้อคอมบูชา เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ พบว่ามีคุณสมบัติคล้ายกับ *Gluconacetobacter* โดยเชื้อผลิตสาร D-sacharic acid-1,4-lactose (DSL) เป็นสารที่ป้องกันการเกิดมะเร็งและลดไขมันในเส้นเลือด และใช้เชื้อนี้สายพันธุ์เดียวในการหมักคอมบูชา ได้ผลิตภัณฑ์ที่ไม่มีเอทานอลเป็นส่วนประกอบ

Soheir And El-Salam (2012) ศึกษาการแยกและจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างคอมบูชา พบแบคทีเรียอะซิติก 6 สายพันธุ์ ส่วนใหญ่อยู่ใน Family *Acetobacteraceae*, จีนัส *Gluconacetobacter* และ *Acetobacter* และพบสายพันธุ์ที่ผลิตกรดอะซิติกได้สูง คือ *Acetobacter aceti*

Nguyen *et al*.,(2015) พบว่า กรดกลูโคโรนิคเป็นเหมือนยาที่ช่วยทำลายสารพิษในมนุษย์พบในคอมบูชา วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ คือ การแยกสายพันธุ์ ยีสต์ และแบคทีเรียอะซิติก ที่สามารถผลิตกรดกลูโคโรนิคในคอมบูชาได้ในปริมาณมากและหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ จากการแยกเชื้อในคอมบูชาพบ *Dekkera bruxellensis* KN89 และ *Gluconacetobacter intermedius* KN89 และใช้อัตราส่วนเชื้อทั้งสองในอัตราส่วน 4:6 อัตราส่วนนี้สามารถผลิตกรดกลูโคโรนิคได้สูง 175.8 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการหมัก 7 วัน

Tehmeena *et al.,* (2016) ศึกษาการคัดแยกเชื้อจากการหมักคอมบูชา โดยใช้อาหารที่เฉพาะกับยีสต์และแบคทีเรียอะซิติก จัดจำแนกโดยการทดสอบทางชีวเคมี และเทคนิคทางชีวโมเลกุล พบ *Zygosaccharomysis bailli.* และ *Komagataeibacter saccharivorans*

Teoh *et al.,* (2004) ทำการคัดแยกเชื้อยีสต์จากคอมบูชา 4 ชนิด เมื่อคัดแยกได้นำไปทดสอบทางชีวเคมีและสรีระวิทยาของยีสต์ พบ *Brettanomyces bruxellensis, Candida stellata, Schizosaccharomyces pombe, Torulaspora delbrueckii* และ *Zygosaccharomyces bailii*

Yong Wang (2013) คัดแยกสายพันธุ์ของแบคทีเรียอะซิติก และหาปริมาณสารประกอบที่มีผลต่อการป้องกันโรคตับในคอมบูชา พบว่า *Gluconacetobacter* sp. ผลิตกรดได้สูงในกระบวนการหมักคอมบูชาจากการหมัก 8 วัน และพบสาร DSL ที่เป็นส่วนประกอบสำคัญในการป้องกันโรคตับ

Liu (1996) ทำการคัดแยกแบคทีเรียอะซิติกและยีสต์จากคอมบูชา ในประเทศไต้หวัน พบแบคทีเรียอะซิติก 2 ชนิด คือ *Acetobacter aceti* และ *Acetobacter pasteurianus* โดยศึกษาสมบัติทางชีวเคมีเทียบกับ *Acetobacter* และพบยีสต์ 3 ชนิด ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosacchomyces bailii* และ *Brettanomyces bruxellensis*

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัตถุดิบ

3.1.1 ชาอู่หลง (ตราสามม้า) เบอร์ 1

3.1.2 น้ำตาลอ้อย (ตรามิตรผล)

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)

3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Acidified PDA

3.2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast extract peptone dextrose agar (YPD)

3.2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ Glucose-Ethanol medium (GEM)

3.2.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ Glucose yeast extract calcium carbonate medium (GYC)

3.2.5 อาหารเลี้ยงเชื้อ Glucose yeast extract (GY)

3.2.6 อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB)

3.2.7 อาหาร Yeast Extract–Peptone–Glycerol (YPG) Medium

3.2.8 อาหาร Christensen's urea agar

3.2.9 อาหาร Fermentation basal medium

3.3 สารเคมี

3.3.1 สารละลายกรดอะซิติก (glacial acetic acid)

3.3.2 Phenolphthalein

3.3.3 สารละลายกลูโคสมาตรฐาน ($C_6H_{12}O_6$)

3.3.4 สารละลายเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 99.9 (C_2H_5OH)

3.3.5 สารละลายโพรพานอล ความเข้มข้นร้อยละ 99.9 (C_3H_8O)

3.3.6 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

3.4 อุปกรณ์

3.4.1 อุปกรณ์เครื่องแก้ว เช่น จานอาหารเลี้ยงเชื้อ หลอดทดลอง บีกเกอร์ ขวดรูปชมพู่ เป็นต้น

3.4.2 กล้องจุลทรรศน์ชนิดพื้นหลังสว่าง (Bright field microscope) (Nikon eclipse 100, Japan)

3.4.3 โหลแก้วขนาด 850 มิลลิลิตร

3.4.4 ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

3.4.5 ตะเกียงแอลกอฮอล์, ลวดเขี่ยเชื้อ

3.4.6 เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง (Balance) (Sartorius BP2215, Switzerland)

3.4.7 เครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) (Tomy, High-Pressure Steam Sterilizer ES-315,Japan)

3.4.8 ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar flow) (Bosstech, Thailand)

3.4.9 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) (Memmert, INB 500, Germany)

3.4.10 ไมโครปิเปต (Micropipettes) (Socorex, Switzerland)

3.4.11 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) (Hermle Labortechnik GmbH, Germany)

3.4.12 เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) (Scientific industrial Inc. Genies2, USA)
3.4.13 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) (Gallenkamp, USA)
3.4.14 เครื่องไมโครเพลตรีดเดอร์ (Microplate reader) (Fluostar omega, Germany)
3.4.15 เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas chromatography) (Shimadzu, GC-2014,Japan)
3.4.16 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) (Memmert, Germany)
3.4.17 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) (Mettler Toledo, USA)
3.4.18 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) (Shimadzu, UV-1601, Japan)
3.4.19 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (Memmert UN 110, Germany)
3.4.20 คิวเวตต์แก้ว (Glass cuvette) (Hellma analytics, Germany)
3.4.21 ไมโครเวฟ (Microwave) (Toshiba ER-SM20(W)TH, Thailand)

3.5 หัวเชื้อคอมบูชาที่ใช้ในการแยกเชื้อยีสต์ และแบคทีเรียอะซิติก

3.5.1 หัวเชื้อคอมบูชาจากกรุงเทพมหานคร
3.5.2 หัวเชื้อคอมบูชาจากนนทบุรี
3.5.3 หัวเชื้อคอมบูชาจากเชียงใหม่

3.6 ขั้นตอนการดำเนินการ

3.6.1 การเตรียมหัวเชื้อคอมบูชา

นำน้ำสะอาดปริมาตร 1 ลิตร ต้มให้เดือดจากนั้นนำชาอู่หลงร้อยละ 0.4 (4 กรัม) ใส่ลงในน้ำที่ต้มเดือดเป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำชาออกจากน้ำชา และเติมน้ำตาลซูโครส ร้อยละ 7 น้ำหนักต่อปริมาตร (70 กรัม) คนให้น้ำตาลละลายทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเทน้ำชาใส่ขวดโหลที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร จากนั้นเติมแผ่นเซลลูโลสจากหัวเชื้อเดิมที่ได้จากกรุงเทพมหานคร นนทบุรีและเชียงใหม่ลงในน้ำชาร้อยละ 3 น้ำหนักโดยปริมาตร (30 กรัม) และเติมส่วนที่เป็นน้ำหมักเดิมร้อยละ 10 ปริมาตรต่อปริมาตร (100 มิลลิลิตร) ปิดปากโหลด้วยผ้าขาวบาง บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10 วัน (Ochaikul and Suklumpoo, 2017)

3.6.2 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชา

นำน้ำสะอาด 1 ลิตร ต้มให้เดือด นำชาอู่หลงร้อยละ 1 น้ำหนักต่อปริมาตร (10 กรัม) ใส่ลงในน้ำเดือด 5 นาที จากนั้นนำชาออก เติมน้ำตาลซูโครสร้อยละ 15 น้ำหนักต่อปริมาตร (150 กรัม) ละลายให้เข้ากันจากนั้นต้มต่อที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เป็นการพาสเจอร์ไรซ์ ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำน้ำชาใส่ขวดหมักที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ขวดละ 400 มิลลิลิตร เติมแผ่นเซลลูโลสจากหัวเชื้อเดิมที่ได้จากกรุงเทพมหานคร นนทบุรีและเชียงใหม่ลงในน้ำชาร้อยละ 3 น้ำหนักต่อปริมาตร (12 กรัม) และน้ำหมักเดิมที่ได้จากกรุงเทพมหานคร นนทบุรีและเชียงใหม่ร้อยละ 10 ปริมาตรต่อปริมาตร (40 มิลลิลิตร) หมักที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10 วัน (Ochaikul and Suklumpoo, 2017) เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน เพื่อใช้ในศึกษาการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในกลุ่มยีสต์และแบคทีเรียอะซิติก การตรวจนับปริมาณเชื้อยีสต์ใช้อาหาร acidified PDA (potato dextrose agar ปรับพีเอชเท่ากับ 4.5 ด้วยสารละลายกรด

ทาร์ทาริก) และการตรวจนับปริมาณแบคทีเรียอะซิติก ใช้อาหาร Glucose-Ethanol medium (GEM) (ยีสต์สกัด 5 กรัม กลูโคส 20 กรัม เอทานอลร้อยละ 95 ปริมาตร2.5 มิลลิลิตร วุ้น 18 กรัม และน้ำกลั่น 1 ลิตร) และ Glucose yeast extract calcium carbonate medium (GYC) (ยีสต์สกัด 10 กรัม แคลเซียมคาร์บอเนต 20 กรัม กลูโคส 20 กรัม วุ้น 18 กรัม และน้ำกลั่น 1 ลิตร) โดยใช้เทคนิค spread plate (Tehmeena *et al*.,2016)

3.6.3 การแยกยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกจากคอมบูชา

หมักคอมบูชาเป็นเวลา 10 วัน เก็บตัวอย่างกระบวนการหมักทุก 2 วัน เก็บตัวอย่างจากส่วนบน ส่วนกลาง และส่วนล่างของภาชนะหมัก ปริมาตรทั้งหมด 10 มิลลิลิตร ทำการเจือจางที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมและ นำมา spread plate โดยใช้อาหาร acidified PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ตรวจนับปริมาณยีสต์พร้อมทั้งเก็บโคโลนีจำนวน 20 โคโลนี ต่อครั้งของการเก็บตัวอย่าง นำโคโลนีเดี่ยวเลี้ยงในอาหารผิวเอียง Yeast extract peptone dextrose agar (YPD) ซึ่งประกอบด้วย ยีสต์สกัด 10 กรัม เปปโตน 10 กรัม กลูโคส 20 กรัม วุ้น 18 กรัม และน้ำกลั่น 1 ลิตร สำหรับแบคทีเรียอะซิติก นำแผ่นเซลลูโลสที่ผิวหน้า 5 กรัม หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ นำมาผสมกับเอนไซม์ ACCELLERASE 1500 ที่ผ่านการกรองฆ่าเชื้อ ความเข้มข้นเอนไซม์ 1 มิลลิลิตรต่อกรัมของเซลลูโลส เติมอะซิเตทบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 5 ที่ผ่านการกรองฆ่าเชื้อ ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (waterbath) ที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำส่วนของเหลวมาผสมกับส่วนน้ำของคอมบูชาปริมาตร 5 มิลลิลิตร เจือจางตัวอย่างที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมนำมา spread plate โดยใช้อาหาร GEM และ GYC นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บโคโลนีจำนวน 20 โคโลนี ต่อครั้งของการเก็บตัวอย่าง เลี้ยงในอาหาร Glucose yeast extract (GY) (ประกอบด้วย ยีสต์สกัด 10 กรัม กลูโคส 20 กรัม วุ้น 18 กรัม และน้ำกลั่น 1 ลิตร) เพื่อนำไปศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมี (Nguyen *et al*., 2015)

3.6.4 การทำเชื้อจุลินทรีย์ให้บริสุทธิ์

นำเชื้อยีสต์ที่แยกได้จากข้อ 3.6.3 ทำให้บริสุทธิ์โดยการ cross streak plate บนอาหาร YPD บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำแบคทีเรียอะซิติกที่แยกได้ทำให้บริสุทธิ์โดยการ cross streak plate บนอาหาร GY บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำโคโลนีเดี่ยวของยีสต์เลี้ยงในอาหารเหลว YPD และโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียอะซิติก เลี้ยงในอาหารเหลว GY บนเครื่องเขย่าเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เก็บเชื้อไว้ในกลีเซอรอลร้อยละ 25 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.6.5 การศึกษาความสามารถในการผลิตเอทานอลและความสามารถทนกรดจากเชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้จากกระบวนการหมักคอมบูชา

3.6.5.1 เตรียมหัวเชื้อยีสต์ในการหมัก

เลี้ยงเชื้อยีสต์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จากข้อ 3.6.4 นำมาขีด (streak) บนอาหารเอียง YPD บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อเป็นสต๊อกเชื้อใหม่ ถ่ายเชื้อจำนวน 1 ลูปลงใน อาหารเหลว YPD ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าควบคุม

อุณหภูมิที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำสารละลายเซลล์ยีสต์ที่ได้นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5 และนำมาใช้ในการเป็นหัวเชื้อในการหมัก (Zhou *et al*., 2014)

3.6.5.2 ทดสอบความสามารถในการผลิตเอทานอลและความสามารถในการทนกรด

เตรียมอาหารชาอู่หลงที่มีพีเอชเท่ากับ 3.0 โดย นำน้ำสะอาด 1 ลิตร ต้มให้เดือด นำชาอู่หลงร้อยละ 1 น้ำหนักต่อปริมาตร (10 กรัม) ใส่ลงในน้ำเดือด 5 นาที จากนั้นนำชาออก เติมน้ำตาลซูโครสร้อยละ 15 น้ำหนักต่อปริมาตร (150 กรัม) ละลายให้เข้ากัน จากนั้นต้มต่อที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อเป็นการพาสเจอร์ไรซ์ ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับพีเอชให้ได้เท่ากับ 3.0 โดยใช้ชาที่ผ่านการหมักเป็นเวลา 10 วัน กรองเซลลูโลสออก และฆ่าเชื้อชาหมักโดยการพาสเจอร์ไรซ์ ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำชาอู่หลงที่ปรับพีเอชแล้ว เทใส่ flask ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมหัวเชื้อยีสต์ จากข้อ 3.6.5.1 ร้อยละ 10 ปริมาตรต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างวิเคราะห์การเจริญของยีสต์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร นำน้ำหมักมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสมาวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลโดยใช้แก๊สโครมาโทกราฟ (Nguyen *et al*., 2015) คัดเลือกไอโซเลตที่สามารถเจริญได้สูงและผลิตแอลกอฮอล์ได้สูงนำมาใช้ในการจัดจำแนก

3.6.6 ศึกษาความสามารถในการผลิตกรดทั้งหมด (ร้อยละกรดอะซิติก)จากแบคทีเรียอะซิติกที่แยกได้

3.6.6.1 เตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียอะซิติกในการหมัก

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียอะซิติกที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จากข้อ 3.6.4 นำมาขีด (streak) บนอาหารเอียง GY บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อเป็นสต็อกเชื้อใหม่ ใช้ลูปเขี่ยเชื้อจาก GY slant ลงใน อาหารเหลว GY ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำสารละลายเซลล์แบคทีเรียที่ได้นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5 นำมาใช้ในการเป็นหัวเชื้อในการหมัก (Zhou *et al*., 2014)

3.6.6.2 ทดสอบความสามารถในการผลิตกรดทั้งหมด (ร้อยละกรดอะซิติก)

เตรียมอาหารชาอู่หลง โดย นำน้ำสะอาด 1 ลิตร ต้มให้เดือด นำชาอู่หลงร้อยละ 1 น้ำหนักต่อปริมาตร ใส่ลงในน้ำเดือด 5 นาที จากนั้นนำชาออก เติมน้ำตาลซูโครสร้อยละ 15 น้ำหนักต่อปริมาตร ละลายให้เข้ากัน จากนั้นต้มต่อที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อเป็นการพาสเจอร์ไรซ์ ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง บรรจุลงในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมหัวเชื้อแบคทีเรียอะซิติก จากข้อ 3.6.6.1 ร้อยละ 10 ปริมาตรต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน เก็บตัวอย่างวันที่ 10 นำน้ำหมักมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสมาวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมด (ร้อยละกรดอะซิติก)โดยใช้วิธีการไทเทรต (ดัดแปลงจาก Nguyen *et al*., 2015) และวัดพีเอชของน้ำหมัก คัดเลือกไอโซเลตที่ผลิตกรดได้สูงมาใช้ในการจัดจำแนก

3.6.7 การจัดจำแนกยีสต์

3.6.7.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ยีสต์

นำเชื้อยีสต์เลี้ยงบนอาหาร YPD บ่ม ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นศึกษาลักษณะ รูปร่างของเซลล์ยีสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยย้อมสีด้วยน้ำยาเมทธีลีนบลู

3.6.7.2 การจัดจำแนกเชื้อยีสต์ด้วยข้อมูลทางพันธุกรรม

การสกัดดีเอ็นเอ นำเชื้อที่คัดแยกได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว YPD ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอของยีสต์ ด้วยชุดทดลองสกัดดีเอ็นเอ FavorPrepTM Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit (Favorgen) และเก็บจีโนมิคดีเอ็นเอที่สกัดได้ ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเพิ่มปริมาณยีน internal transcribed spacer ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน ITS1 forward 5′- CCGGGAACGTATTCACCG-3′ และ ITS4 reverse 5′- GCYTAAYACATGCAAGTCGA-3′ โดยส่วนประกอบในปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย 1×PCR buffer, dNTP 200 µM , ไพรเมอร์ forward และ reverse อย่างละ 0.2 µM., Taq DNA polymerase (RBC) 1 ยูนิต และจีโนมิคดีเอ็นเอ 20 ng 2 µl. ปริมาตรสุทธิ 25 µl. สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ แสดงดังตารางที่ 3.1 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยร้อยละ 1.2 agarose gel electrophoresis ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอใต้แสงยูวี หลังจากนั้นนำยีนที่เพิ่มปริมาณแล้วทำให้บริสุทธิ์ ด้วยชุด FavorPrepTM PCR Clean Up Kit (Favorgen) วัดปริมาณดีเอ็นเอด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร โดยดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์สูงมีค่า A_{260}/A_{280} เท่ากับ 1.8-2.0

ตารางที่ 3.1 อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ดีเอ็นเอจากยีสต์เป็นต้นแบบ

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	จำนวนรอบ
Initial Denaturing	95	5 นาที	1 รอบ
Denature	95	30 วินาที	30 รอบ
Annealing	55	30 วินาที	
Extension	72	1 นาที	
Final extension	72	5 นาที	1 รอบ

โคลนชิ้น PCR product เข้ากับพลาสมิดนำหลอดทดลองขนาด 0.5 มิลลิลิตร แช่ในน้ำแข็งก่อน และเตรียม ligation reaction ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ประกอบด้วย Ligation Buffer A 0.5 ไมโครลิตร, Ligation Buffer B ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร, T&A cloning vector ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, PCR product 2.5 ไมโครลิตร และT4 ligase 0.5 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากันโดยการดูดสารขึ้นลงเบาๆ ปั่นเหวี่ยงให้สารละลายตกที่ก้นหลอดทดลอง บ่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง ก่อนนำมา Transformation

การนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน การเตรียม competent cell นำ seed stock XL1B 1 ไมโครลิตร เลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 250 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง ให้ได้ความค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เท่ากับ 0.3 นำออกจากเครื่องเขย่าแล้วนำไปแช่น้ำแข็ง 5 นาที จากนั้นนำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง เก็บตะกอนเซลล์ เติม CCMB80 buffer 15 มิลลิลิตร ผสมเบาๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติมอาหารเหลว LB 200 ไมโครลิตรลงใน *E.coli* suspension 50 ไมโครลิตร ปรับค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เท่ากับ 1.0-1.5 โดย CCMB80 buffer บ่มบนน้ำแข็ง 20 นาที แบ่งใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียส ได้เป็น competent cell นำไปใช้ในการ transformant โดยนำ ligation reaction 1 ไมโครลิตร เติมลงใน competent cells ที่เตรียมไว้ ผสมเบาๆ บ่มในกระบะน้ำแข็ง 30 นาที จากนั้นนำไปแช่ลงในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที เมื่อครบเวลาเอาหลอดออกแล้วนำไปแช่ในกระบะน้ำแข็ง 10 นาที เติมอาหารเหลว LB 250 ไมโครลิตร บ่มในสภาวะเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำเซลล์มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin x-gal ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และIPTG ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ เพื่อคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับ Recombination plasmid นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ตรวจสอบโคโลนีที่เจริญบนอาหารด้วยวิธี Blue/white selection โดยให้ความเย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนาน 1 ชั่วโมง ตรวจสอบ Recombination plasmid ด้วยเทคนิค Colony PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน M13 forward 5′- GTTTTCCCAGTCACGAC-3′ และ M13 reverse 5′- CAGTATCGACAAAGGACACACT-3′ โดยส่วนประกอบในปฏิกิริยา PCR ปริมาตรสุทธิ 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10x buffer ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร, 0.2 mM dNTP ปริมาตร 0.25 ไมโครลิตร, 0.25mM Forward และ Reverse primer ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร, RBC taq DNA polymerase ปริมาตร 0.125 ไมโครลิตร, Template ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร และน้ำ ปริมาตร 20.625 ไมโครลิตร สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ดังตารางที่ 3.2 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอใต้แสงยูวี สกัดพลาสมิดออกจากเซลล์แบคทีเรียด้วยชุดทดลอง FavorPrep Plasmid Extraction Minikit เก็บรักษาผลผลิตพีซีอาร์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นส่งชิ้นดีเอ็นเอไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยบริษัทเอกชน (SolGent) วิเคราะห์พีคด้วยโปรแกรม Chromas เวอร์ชั้น 2.6.2 แล้วนำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ Genbank ในNCBI โดยใช้ BLASTN (Altschul, 1990) เพื่อหาว่าลำดับนิวคลีโอทด์ตรงกับแบคทีเรียสายพันธุ์ใดจากนั้นลงทะเบียนข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียที่แยกได้เข้าใน GenBank

ตารางที่ 3.2 อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ดีเอ็นเอจาก Colony เป็นต้นแบบ

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	จำนวนรอบ
Initial Denaturing	94	5 นาที	1 รอบ
Denature	94	30 วินาที	30 รอบ
Annealing	55	30 วินาที	
Extension	72	1 นาที	
Final extension	72	7 นาที	1 รอบ

3.6.7.3 ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของยีสต์

1) ความสามารถในการหมักน้ำตาล

เตรียมหัวเชื้อยีสต์ โดยทำการเจือจางยีสต์ที่เจริญในอาหาร YM เป็นเวลา 24 ชั่วโมงด้วยน้ำกลั่น และเทียบความขุ่นจาก McFarland standard เบอร์ 3 ใส่เชื้อลงในอาหาร fermentation base medium ผสมกับน้ำตาลที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ Glucose, Galactose, Lactose, Maltose, Sucrose, Melibiose, Raffinose และ Trehalose รวมทั้งใส่หลอดดักแก๊ส (Durham tube) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน สังเกตการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ ผล + หมายถึง อาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและมีแก๊สเกิดในหลอดดักแก๊สแสดงว่าเชื้อมีการหมักน้ำตาล ใช้อาหาร fermentation base medium เป็นชุดควบคุม (Kurtzman and Fell,1996)

2) ความสามารถในการใช้สารประกอบคาร์บอน

เลี้ยงเชื้อยีสต์ในอาหารแข็ง YPD บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยเชื้อลงในอาหารเหลว API และเทียบความขุ่นจาก McFarland standard เบอร์ 3 ดูดเชื้อลงในแถบทดสอบ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ทำการอ่านผลโดย + หมายถึง แถบทดสอบขุ่น และ - หมายถึง แถบทดสอบใส เมื่อบันทึกผลเสร็จแล้วนำไปเทียบใน API web

3) ความสามารถในการใช้ยูเรีย

เลี้ยงเชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้ลงบนอาหารเอียง Christensen’s urea agar บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ทำการอ่านผลโดย + หมายถึง อาหารเปลี่ยนสีเป็นสีชมพู และ – หมายถึง อาหารไม่มีการเปลี่ยนสี (Christensen, 1946)

3.6.8 การจัดจำแนกแบคทีเรียอะซิติก

3.6.8.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียอะซิติก

นำแบคทีเรียอะซิติกที่แยกได้มาเลี้ยงบนอาหาร GY บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยการย้อมแกรม แบคทีเรียออะซิติก มีลักษณะเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อน

3.6.8.2 การจัดจำแนกแบคทีเรียอะซิติกด้วยข้อมูลทางพันธุกรรม

การสกัดดีเอ็นเอ นำเชื้อที่คัดแยกได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว GY ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอของแบคทีเรีย ด้วยชุดทดลองสกัดดีเอ็นเอ FavorPrepTM Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit (Favorgen) และเก็บจีโนมิคดีเอ็นเอที่สกัดได้ ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน 16s rDNA forward 5′-CCCGGGAACGTATTCACCG-3′ และ reverse5′-GCYTAAYACATGCAAGTCGA-3′ โดยส่วนประกอบในปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย 1×PCR buffer, dNTP 200 µM , ไพรเมอร์ forward และ reverse อย่างละ 0.2 µM., Taq DNA polymerase (RBC) 1 Unit และจีโนมิคดีเอ็นเอ 20 ng 2 µl. ปริมาตรสุทธิ 25 µl. สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ แสดงดังตารางที่ 3.3 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วย 1.2 เปอร์เซ็นต์ agarose gel electrophoresis ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอใต้แสงยูวี หลังจากนั้นทำยีนที่เพิ่มปริมาณแล้วให้บริสุทธิ์ด้วยชุด FavorPrepTM PCR Clean Up Kit (Favorgen) วัดปริมาณดีเอ็นเอด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร

ตารางที่ 3.3 อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ดีเอ็นเอจากแบคทีเรียเป็นต้นแบบ

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	จำนวนรอบ
Initial Denaturing	94	3 นาที	1 รอบ
Denature	94	30 วินาที	
Annealing	58	30 วินาที	25 รอบ
Extension	72	1.30 นาที	
Final extension	72	7 นาที	1 รอบ

การเชื่อมต่อชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเข้ากับพลาสมิด นำหลอดทดลองขนาด 0.5 มิลลิลิตร แช่ในกระบะน้ำแข็งก่อน และเตรียม ligation reaction ประกอบด้วย T&A cloning vector 25 ng/µl, T4 DNA ligase 2 Unit, 10X Ligation Buffer A, 10X Ligation buffer B และผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ผสมสารให้เข้ากันโดยการดูดสารขึ้นลงเบาๆ ปั่นเหวี่ยงให้สารละลายตกที่ก้นหลอดทดลอง บ่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน การเตรียม competent cell โดยนำ starter XL1B มา streak บนอาหารแข็ง LB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยเชื้อลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตรในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง ให้ได้ความค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เท่ากับ 0.3 – 0.4 นำไปแช่ในกระบะน้ำแข็ง 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งส่วนใส และละลายตะกอนเซลล์ด้วย $CaCl_2$ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ 600 ไมโครลิตร นำไปแช่ในกระบะน้ำแข็ง 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศา

เซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งส่วนใส ละลายตะกอนเซลล์ด้วย $CaCl_2$ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ 100 ไมโครลิตร ได้เป็น competent cell นำไปใช้ในการ transformant โดยนำ ligation reaction 1 ไมโครลิตร เติมลงใน competent cells ที่เตรียมไว้ ผสมเบาๆ บ่มในกระบะน้ำแข็ง 30 นาที จากนั้นนำไปแช่ลงในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที เมื่อครบเวลาเอาหลอดออกแล้วนำไปแช่ในกระบะน้ำแข็ง 10 นาที เติมอาหารเหลว LB 250 ไมโครลิตร บ่มในสภาวะเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำเซลล์มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin x-gal ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และIPTG ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ เพื่อคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับ Recombination plasmid นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ตรวจสอบโคโลนีที่เจริญบนอาหารด้วยวิธี Blue/white selection โดยให้ความเย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนาน 1 ชั่วโมง ตรวจสอบ Recombination plasmid ด้วยเทคนิค Colony PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับ M13 forward 5′-GTTTTCCCAGTCACGAC-3′ และ M13 reverse 5′- CAGTATCGACAAAGGACACACT-3′ โดยส่วนประกอบในปฏิกิริยา PCR ปริมาตรสุทธิ 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10x buffer ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร, 0.2 mM dNTP ปริมาตร 0.25 ไมโครลิตร, 0.25mM Forward และ Reverse primer ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร, RBC taq DNA polymerase ปริมาตร 0.125 ไมโครลิตร, Template ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร และน้ำปริมาตร 20.625 ไมโครลิตร สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ดังตารางที่ 3.4 ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอใต้แสงยูวี สกัดพลาสมิดออกจากเซลล์แบคทีเรียด้วยชุดทดลอง FavorPrep Plasmid Extraction Minikit เก็บรักษาผลผลิตพีซีอาร์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นส่งชิ้นดีเอ็นเอไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยบริษัทเอกชน (SolGent) วิเคราะห์พีคด้วยโปรแกรม Chromas เวอร์ชั้น 2.6.2 แล้วนำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ Genbank ในNCBI โดยใช้ BLASTN (Altschul, 1990) เพื่อหาว่าลำดับนิวคลีโอทด์ตรงกับแบคทีเรียสายพันธุ์ใดจากนั้นลงทะเบียนข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียที่แยกได้เข้าใน GenBank

ตารางที่ 3.4 อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ดีเอ็นเอจาก Colony เป็นต้นแบบ

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	จำนวนรอบ
Initial Denaturing	94	5 นาที	1 รอบ
Denature	94	30 วินาที	30 รอบ
Annealing	55	30 วินาที	
Extension	72	1 นาที	
Final extension	72	7 นาที	1 รอบ

3.6.8.3 ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียอะซิติก

1) ทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตาเลส (Catalase test)

โดยหยด 3 % ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ลงบนสไลด์ เขี่ยเชื้อที่ทดสอบลงไปผสม สังเกตการเปลี่ยนแปลง ถ้ามีฟองแก๊สเกิดขึ้นแสดงว่ามีการสร้างเอนไซม์คะตาเลส (Soheir., 2012)

2) ทดสอบการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส (Oxidase test)

เลี้ยงแบคทีเรียอะซิติกบนอาหาร GY slant บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้ไม้แหลมปลอดเชื้อเขี่ยเชื้อมาแตะที่กระดาษกรองที่มีสาร oxidase reagent ถ้าเกิดสีม่วงภายใน 10 วินาที แสดงว่าให้ผลเป็นบวก (oxidase positive) (นันทนา, 2537)

3) ทดสอบการออกซิไดซ์อะซิเตท

ตามวิธีของ Leifson (1954) โดยใช้อาหารที่ประกอบด้วย เปปโตน 3 กรัม ยีสต์สกัด 2 กรัม, โซเดียมอะซิเตท และน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร โดยมี 0.002% บรอมไทมอลบลู (Bromthymol blue)ร้อยละ 0.002 เป็นอินดิเคเตอร์ จากนั้นใส่เชื้อที่ใช้ทดสอบปริมาตร 30 ไมโครลิตร บ่มที่ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน สังเกตการเปลี่ยนสีทุกๆ 24 ชั่วโมง อ่านและบันทึกผลโดย + หมายถึง อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน, - หมายถึง อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีเหลือง และ w หมายถึง อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีน้ำเงินแกมเขียว (Asai *et al*, 1964)

4) ทดสอบการออกซิเดชันของเอทานอล ใช้อาหาร Carr medium โดยใช้โบรโมครีซอลกรีน (bromocresol green) เป็นอินดิเคเตอร์ในอาหาร Carr medium บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง สังเกตจากการเปลี่ยนสีของอาหารจากสีเขียวเป็นสีเหลือง แสดงว่า มีการออกซิเดชันเอทานอลได้กรดเกิดขึ้น ซึ่งเป็นแบคทีเรียอะซิติก (Soheir and El-Salam, 2012)

3.6.9 การศึกษาอัตราส่วนผสมของยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกที่แยกได้

3.6.9.1 การเตรียมหัวเชื้อยีสต์

เลี้ยงยีสต์ในอาหารเอียง YPD บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้ลูปเขี่ยเชื้อจากเอียง YPD จำนวน 1 ลูป ลงในอาหารชาอู่หลงหวาน (sweet black tea) ซึ่งประกอบด้วย ชาอู่หลงร้อยละ 0.4 น้ำตาลซูโครสร้อยละ 7 น้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตรชาอู่หลงหวาน 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำสารละลายเซลล์ยีสต์ที่ได้วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5 นำมาใช้ในการเป็นหัวเชื้อในการหมัก (Zhou *et al*., 2014)

3.6.9.2 การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียอะซิติก

เลี้ยงแบคทีเรียอะซิติกในอาหารแข็งเอียง GY บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้ลูปเขี่ยเชื้อจากอาหารแข็งเอียง GY ลงในอาหารชาอู่หลงหวาน (sweet black tea) ประกอบด้วย ชาอู่หลงร้อยละ 0.4 น้ำตาลซูโครสร้อยละ 7 น้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตรชาอู่หลงหวาน 50 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำสารละลายเซลล์แบคทีเรียอะซิติกที่ได้นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5 นำมาใช้ในการเป็นหัวเชื้อในการหมัก (Zhou *et al*., 2014)

3.6.9.3 การหมักคอมบูชาโดยใช้เชื้อที่แยกได้

เตรียมอาหารชาอู่หลงหวานโดย นำน้ำสะอาด 1 ลิตร ต้มให้เดือด นำชาอู่หลงร้อยละ 1 น้ำหนักต่อปริมาตร ใส่ลงในน้ำเดือด 5 นาที จากนั้นนำชาออก เติมน้ำตาลซูโครสร้อยละ 15 น้ำหนักต่อปริมาตร ละลายให้เข้ากัน ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นใส่โหลหมักที่ฆ่าเชื้อแล้ว 1000 มิลลิลิตร เติมหัวเชื้อยีสต์และหัวเชื้อแบคทีเรียอะซิติกตามอัตราส่วนยีสต์ต่อแบคทีเรียอะซิติก

เท่ากับ 7:3 6:4 5:5 4:6 3:7 หมักเป็นเวลา 0, 7, 10, 14 และ 21 วัน นำน้ำหมักมากรองด้วยผ้าขาวบาง และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที นำส่วนใสวิเคราะห์ค่าต่างๆ ได้แก่ พีเอชน้ำหมัก ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติกด้วยการไทเทรต ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีฟีนอลซัลฟูริก ปริมาณแอลกอฮอล์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตรกราฟ ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชั่น โดยวิธี DPPH และทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัส

3.6.9.4 ศึกษาคุณภาพทางเคมี และคุณภาพทางประสาทสัมผัสของคอมบูชาที่ผลิตได้

นำส่วนใสที่ได้จากคอมบูชาที่ผลิตได้วิเคราะห์ค่าต่างๆดังนี้

1) คุณภาพทางเคมี

1. ค่าความเป็นกรด–ด่าง (pH) ด้วยเครื่องวัดพีเอช

2. ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด ด้วย Hand Refractometer

3. ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติกด้วยการไทเทรต ตามวิธีการของ AOAC (2005)

4. ปริมาณแอลกอฮอล์ วิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ

5. ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี Phenol-sulfuric (Dubois, 1956)

นำตัวอย่างใส่หลอดทดลองปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมฟีนอลความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตรในหลอดทดลองที่มีสารตัวอย่าง จากนั้นเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ทันที ผสมให้เข้ากัน วางที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร บันทึกค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ คำนวณหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดตามสูตรดังนี้ (ใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นมาตรฐาน)

ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)

$$= \frac{(\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร}) \times \text{อัตราการเจือจาง}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน} \times 1000}$$

6. ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยวิธี DPPH

นำตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ที่ละลายในเอทานอล 100 ไมโครลิตร บ่มสารที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที และวัดการลดลงของอนุมูลอิสระ DPPH ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร คำนวณฤทธิ์ในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันตามสมการ ดังนี้

กิจกรรมการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH(ร้อยละ) = [(A control – A sample) / A control] × 100

โดยที่ A sample เป็นค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่เติมสารละลาย DPPH
A blank ของ sample เป็นค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างและน้ำกรอง
A control เป็นค่าการดูดกลืนแสงของเอทานอลที่เติมสารละลาย DPPH
A blank ของ control เป็นค่าการดูดกลืนแสงของเอทานอล

2) คุณภาพทางประสาทสัมผัส

นำคอมบูชากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 นำชาหมักบรรจุขวดที่ฆ่าเชื้อโดยผ่านการลวกน้ำร้อน นำไปพาสเจอไรซ์ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำมาทดสอบทางประสาทสัมผัส โดยใช้การทดสอบความชอบด้วยวิธี 9 Point Hedonic Scale ใช้ผู้ทดสอบชิมที่ไม่ผ่านการฝึกฝนจำนวน 30 คน ซึ่งในการวิเคราะห์ดังกล่าว มีชาหมักทางการค้าเป็นชุดควบคุม

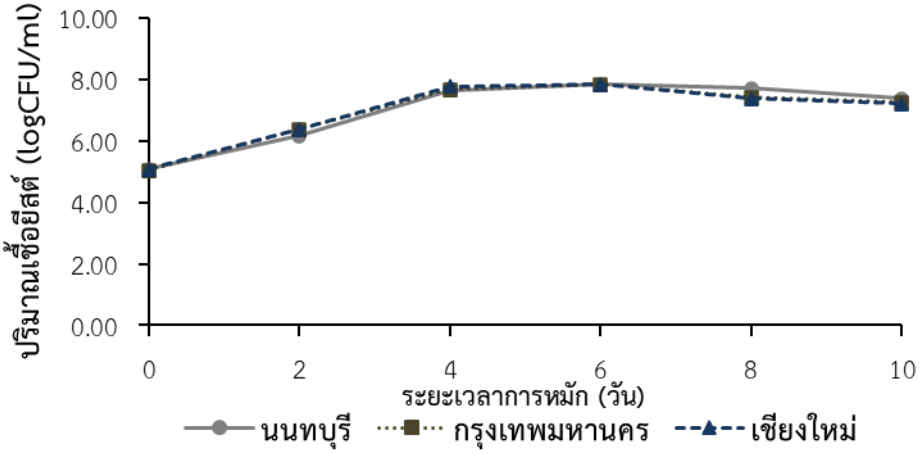
3.6.11 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) มีจำนวน 3 ซ้ำ วิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (ANOVA) และวิเคราะห์ค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างชุดการทดลองที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) โดย Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ใช้โปรแกรม SPSS version 25 ในการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

บทที่ 4
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเชื้อยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกในระหว่างการหมักคอมบูชา

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเชื้อยีสต์จากหัวเชื้อคอมบูชาทั้ง 3 แหล่งได้แก่ นนทบุรี กรุงเทพมหานคร และเชียงใหม่ พบว่าช่วงแรกของการหมักคอมบูชา (2-4 วัน) ปริมาณเชื้อยีสต์จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและมีปริมาณสูงสุดในวันที่ 6 โดยพบอยู่ในช่วง 7.83±0.01 - 7.85±0.01 logCFU/ml. อาจเนื่องจากจุลินทรีย์ในหัวเชื้อเดิมต้องใช้เวลาในการปรับตัวกับอาหารใหม่ หลังจากนั้นปริมาณยีสต์จะลดลงเล็กน้อยจนสิ้นสุดกระบวนการหมัก ในวันที่ 8-10 หัวเชื้อคอมบูชาจากนนทบุรีจะมีปริมาณเชื้อยีสต์สูงกว่าหัวเชื้อจากกรุงเทพมหานคร และเชียงใหม่ โดยพบว่าในวันสุดท้ายของการหมัก (10 วัน) หัวเชื้อคอมบูชาจากนนทบุรี กรุงเทพมหานคร และเชียงใหม่ มีปริมาณยีสต์ 7.39±0.01 7.26±0.01 และ 7.20±0.01 logCFU/ml. ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.1 สำหรับการเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียอะซิติก ระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชาจากหัวเชื้อคอมบูชาทั้ง 3 แหล่ง มีแนวโน้มไปทางเดียวกัน โดยพบว่า ปริมาณแบคทีเรียอะซิติกจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและมีปริมาณสูงสุดในวันที่ 6 จะมีปริมาณแบคทีเรียอะซิติก 7.51±0.01 - 7.71±0.01 logCFU/ml. ในอาหาร GYC และมีปริมาณแบคทีเรียอะซิติก อยู่ในช่วง 7.57±0.01 – 7.69±0.01 logCFU/ml. ในอาหาร GEM หลังจากนั้นปริมาณของแบคทีเรียอะซิติกจะลดลง จนสิ้นสุดกระบวนการหมัก งานวิจัยของ Jayabalan *et al*.,(2008) รายงานว่าในระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชา ระยะแรกยีสต์จะเจริญและเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เปลี่ยนน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเป็นแอลกอฮอล์ จากนั้นแบคทีเรียอะซิติกจะเจริญได้ดีและผลิตกรดอะซิติกได้เพิ่มขึ้น



รูปที่ 4.1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณยีสต์ระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชาด้วยหัวเชื้อคอมบูชาจากแหล่งต่างๆ หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน

ตารางที่ 4.1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณของยีสต์ระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชาด้วยหัวเชื้อคอมบูชาจากแหล่งต่างๆ หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน

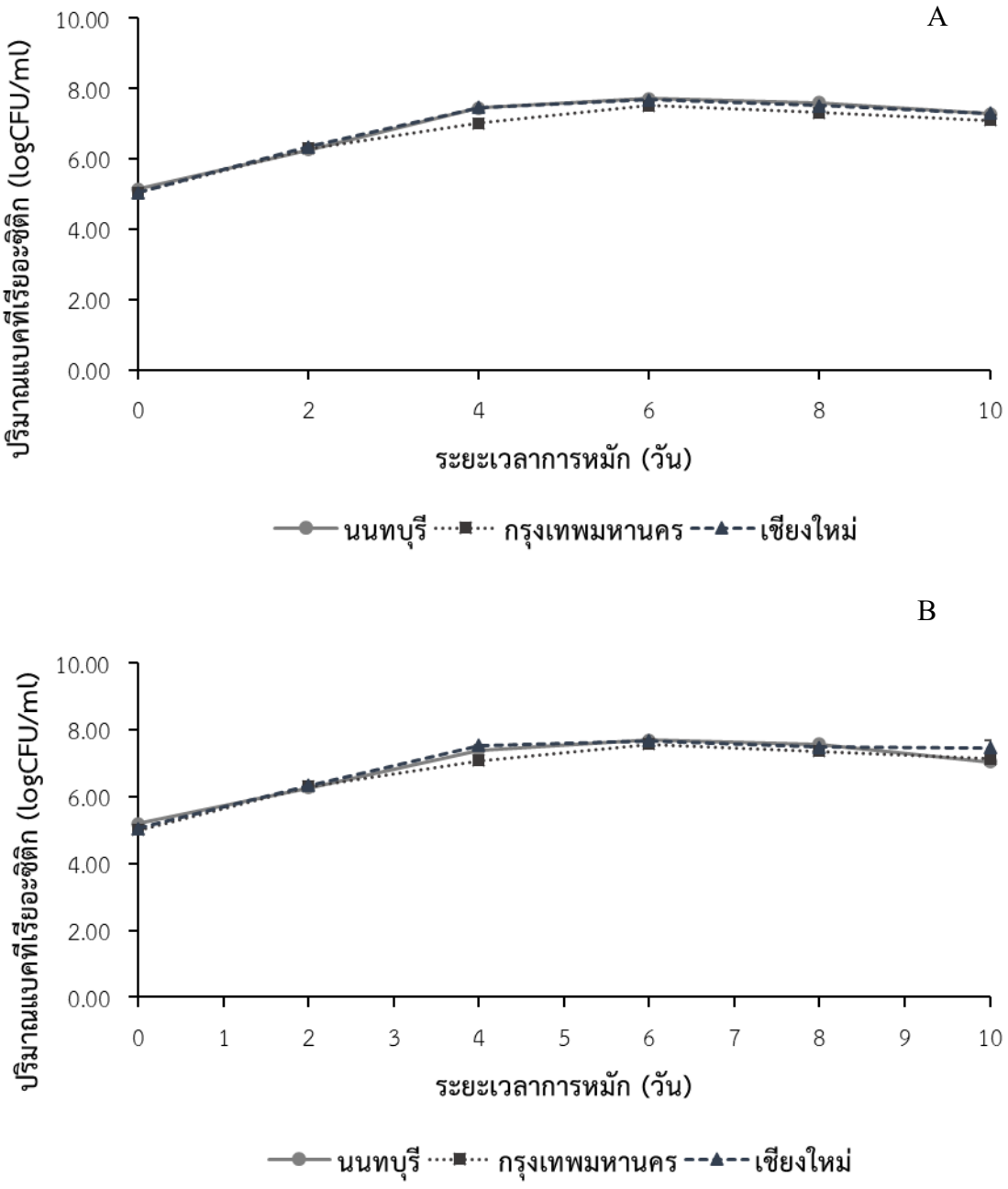
หัวเชื้อคอมบูชา	ปริมาณยีสต์ (logCFU/ml.)					
	ระยะเวลาการหมัก (วัน)					
	0	2	4	6	8	10
นนทบุรี	5.09±0.01^{f}	6.18±0.01^{e}	7.64±0.01^{c}	7.85±0.01^{a}	7.71±0.01^{b}	7.39±0.01^{d}
กรุงเทพมหานคร	5.05±0.01^{f}	6.37±0.01^{e}	7.68±0.01^{b}	7.83±0.01^{a}	7.41±0.01^{c}	7.26±0.01^{d}
เชียงใหม่	5.08±0.01^{f}	6.37±0.01^{e}	7.77±0.01^{b}	7.84±0.01^{a}	7.38±0.01^{c}	7.20±0.01^{d}

หมายเหตุ - ปริมาณยีสต์ (logCFU/ml.) แสดงในรูปค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานทำการทดลอง 3 ซ้ำ
- ^{abcd} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 4.2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียอะซิติกระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชา โดยใช้หัวเชื้อคอมบูชาจากแหล่งต่างๆ หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน

หัวเชื้อคอมบูชา	ปริมาณแบคทีเรียอะซิติก (log CFU/ml.)					
	ระยะเวลาการหมัก (วัน)					
	0	2	4	6	8	10
นนทบุรี						
-อาหาร GYC	5.14±0.01^{f}	6.26±0.01^{e}	7.45±0.01^{c}	7.71±0.01^{a}	7.60±0.01^{b}	7.29±0.01^{d}
-อาหาร GEM	5.20±0.01^{f}	6.27±0.01^{e}	7.41±0.01^{c}	7.69±0.01^{a}	7.58±0.01^{b}	7.04±0.01^{d}
กรุงเทพมหานคร						
-อาหาร GYC	5.04±0.01^{f}	6.30±0.01^{e}	7.01±0.01^{c}	7.51±0.01^{a}	7.31±0.01^{b}	7.10±0.01^{d}
-อาหาร GEM	5.01±0.01^{f}	6.31±0.01^{e}	7.08±0.01^{c}	7.57±0.01^{a}	7.37±0.01^{b}	7.13±0.01^{d}
เชียงใหม่						
-อาหาร GYC	5.05±0.01^{f}	6.34±0.01^{e}	7.47±0.01^{c}	7.69±0.01^{a}	7.51±0.01^{b}	7.30±0.01^{d}
-อาหาร GEM	5.07±0.01^{f}	6.34±0.01^{e}	7.54±0.01^{c}	7.68±0.01^{a}	7.48±0.01^{b}	7.46±0.01^{d}

หมายเหตุ - ปริมาณแบคทีเรีย (logCFU/ml.) แสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ
- ^{abcd} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)



รูปที่ 4.2 การเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียอะซิติกระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชาโดยใช้หัวเชื้อคอมบูชาจากแหล่งต่างๆ หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน A: อาหาร GYC และ B: อาหาร GEM

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของคอมบูชา พบว่าการหมักคอมบูชาด้วยหัวเชื้อคอมบูชาทั้ง 3 แหล่ง มีการเปลี่ยนแปลงไปในทิศทางเดียวกัน โดยปริมาณกรดทั้งหมด (ร้อยละกรดอะซิติก) จะเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการหมัก และสูงสุดในวันที่ 10 ซึ่งเป็นวันสุดท้ายของการหมัก มีปริมาณกรดในช่วง

ร้อยละ 0.42 – 0.44 ซึ่งสอดคล้องกับค่าพีเอชที่วัดได้จะลดลงตลอดการหมักเช่นกัน ซึ่งมีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 2.85 ± 0.01 - 2.94 ± 0.01 แสดงดังตารางที่ 4.3, 4.4 และรูปที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดทั้งหมด (ร้อยละกรดอะซิติก) ระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชาด้วยหัวเชื้อคอมบูชาจากแหล่งต่างๆ หมักที่อุณหภูมิห้องนาน 10 วัน

หัวเชื้อคอมบูชา	ปริมาณกรดทั้งหมด(ร้อยละกรดอะซิติก)					
	ระยะเวลาการหมัก (วัน)					
	0	2	4	6	8	10
นนทบุรี	0.05±0.01^{a}	0.07±0.01^{a}	0.10±0.00^{a}	0.13±0.01^{b}	0.21±0.01^{b}	0.42±0.00^{b}
กรุงเทพมหานคร	0.06±0.01^{a}	0.08±0.01^{a}	0.10±0.00^{a}	0.16±0.01^{a}	0.25±0.01^{a}	0.44±0.01^{b}
เชียงใหม่	0.05±0.01^{a}	0.08±0.01^{a}	0.10±0.00^{a}	0.15±0.01^{a}	0.27±0.01^{a}	0.43±0.01^{a}

หมายเหตุ - ปริมาณกรดทั้งหมด(ร้อยละกรดอะซิติก)แสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานทำการทดลอง 3ซ้ำ

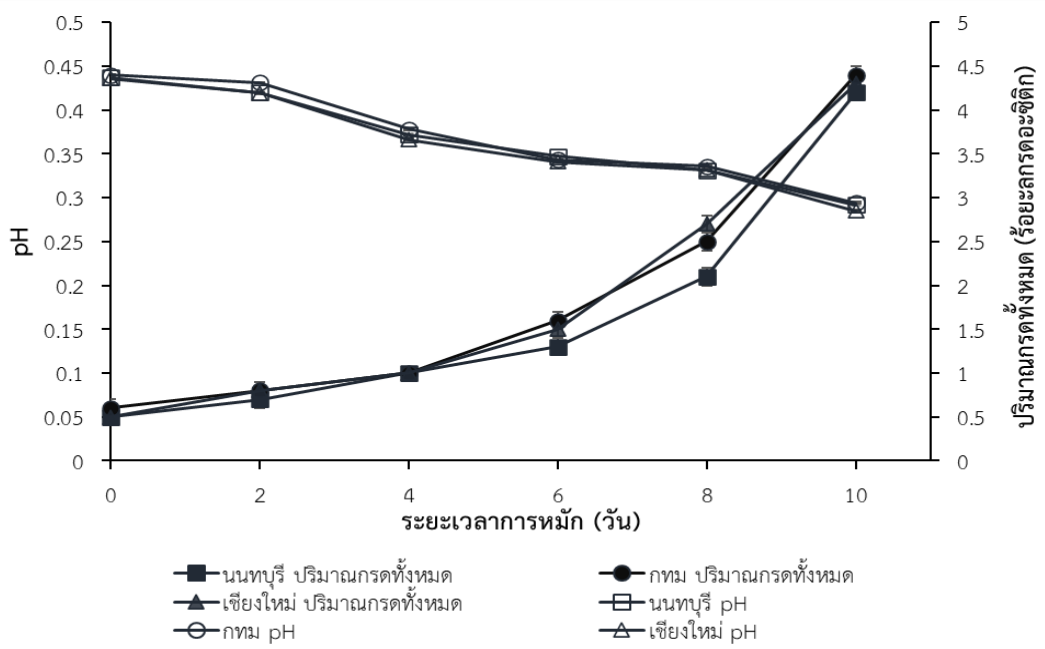
- ^{abcd} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 4.4 การเปลี่ยนแปลงของพีเอชระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชาด้วยหัวเชื้อคอมบูชาจากแหล่งต่างๆ หมักที่อุณหภูมิห้องนาน 10 วัน

หัวเชื้อคอมบูชา	พีเอช					
	ระยะเวลาการหมัก (วัน)					
	0	2	4	6	8	10
นนทบุรี	4.37±0.01^{b}	4.20±0.01^{b}	3.72±0.01^{b}	3.47±0.01^{a}	3.31±0.01^{b}	2.92±0.01^{b}
กรุงเทพมหานคร	4.40±0.01^{a}	4.31±0.01^{a}	3.78±0.01^{a}	3.43±0.01^{b}	3.36±0.01^{a}	2.94±0.01^{a}
เชียงใหม่	4.36±0.01^{b}	4.19±0.01^{c}	3.66±0.01^{c}	3.41±0.01^{c}	3.32±0.01^{b}	2.85±0.01^{c}

หมายเหตุ - พีเอช แสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

- ^{abcd} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)



รูปที่ 4.3 ปริมาณกรดทั้งหมด (ร้อยละกรดอะซิติก) และค่าพีเอชระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชาโดยใช้หัวเชื้อคอมบูชาจากแหล่งต่างๆ หมักที่อุณหภูมิห้องนาน 10 วัน

4.2 ผลการคัดแยกและคัดเลือกยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตเอทานอลและทนกรด

จากการคัดแยกเชื้อยีสต์ในระหว่างการหมักคอมบูชาจากหัวเชื้อคอมบูชาทั้ง 3 แหล่ง เก็บโคโลนีเดี่ยวของยีสต์ได้ทั้งหมด 360 ไอโซเลต ดูลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยการย้อมสีเมทิลีนบลู พบว่าเป็นยีสต์ 97 ไอโซเลต และจากการทดสอบความสามารถในการผลิตแอลกอฮอล์และความสามารถในการทนกรด โดยนำมาเพาะเลี้ยงในชาอู่หลงที่มีพีเอช 3.0 หมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน พบว่า ไอโซเลต YN403 สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้สูงสุดร้อยละ 4.91±0.17 โดยปริมาตร รองลงมาเป็นไอโซเลต YN3 YN204 YN404 และ YC6 ซึ่งสามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้ร้อยละ 4.79±0.22, 4.63±0.29, 4.36±0.64 และ 4.34±061 ตามลำดับ จากการศึกษาการเจริญของไอโซเลตยีสต์ที่แยกได้ในชาอู่หลงที่มีพีเอช 3.0 พบว่าไอโซเลต YN403 มีการเจริญสูงกว่าไอโซเลตอื่นๆ โดยมีค่าการดูดกลืนแสง 1.28±0.03 รองลงมาเป็นไอโซเลต YN3 YN204 YN404 และ YC6 ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสง 1.05±0.03, 0.98±0.03, 0.85±0.03 และ 0.76±0.01 ตามลำดับ ซึ่งมีค่ามากกว่างานวิจัยของ Nguyen *et al*., (2015) นำไอโซเลตยีสต์ที่คัดแยกได้เลี้ยงในอาหารชาดำที่มีพีเอช 3.0 พบว่าค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดเท่ากับ 0.68 แสดงดังตารางที่ 4.5 และรูปที่ 4.4 ไอโซเลตของยีสต์ที่เจริญได้ดีในชาอู่หลงที่มีพีเอช 3.0 จะสามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้สูงเช่นกัน Jayabalan *et al.,* (2014) กล่าวว่าในหัวเชื้อคอมบูชายีสต์จะย่อยน้ำตาลซูโครสเป็นน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตส และใช้น้ำตาลฟรุกโตสในการหมักเอทานอล แบคทีเรียอะซิติกจะนำ

เอทานอลไปผลิตกรดอะซิติก มีผลทำให้คอมบูชามีพีเอชลดลง ดังนั้นเพื่อรักษาสมดุลของยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกให้อยู่ร่วมกันในกระบวนการหมักยีสต์ที่ใช้จะต้องเป็นสายพันธุ์ที่ทนกรดได้สูง

ตารางที่ 4.5 ปริมาณแอลกอฮอล์และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรของไอโซเลตยีสต์ หมักในชาอู่หลงที่มีพีเอช 3.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน

ไอโซเลตยีสต์	ปริมาณเอทานอล (ร้อยละ)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร
YN403	4.91 ± 0.17 [a]	1.28±0.03 [a]
YN3	4.79 ± 0.22 [a]	1.05±0.03 [b]
YN204	4.63 ± 0.29 [ab]	0.98±0.03 [c]
YN404	4.36 ± 0.64 [b]	0.85±0.03 [d]
YC6	4.34 ± 0.61 [b]	0.76±0.01 [e]
YN4	4.28 ± 0.09 [b]	0.69±0.01 [f]
YN1002	4.25 ± 0.47 [b]	0.68±0.03 [f]
YN2	4.25 ± 0.47 [b]	0.68±0.01 [f]
YC9	3.84 ± 0.05 [bc]	0.56±0.03 [g]
YC8	3.81 ± 0.08[c]	0.48±0.01 [h]

หมายเหตุ - [abcd] ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

4.3 การคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียอะซิติกที่มีความสามารถในการผลิตกรด

คัดแยกไอโซเลตแบคทีเรียอะซิติกได้ 360 ไอโซเลต เมื่อนำมาย้อมแกรมพบว่า เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปท่อน 99 ไอโซเลต นำมาทดสอบความสามารถในการผลิตกรดในชาอู่หลง หมักในสภาวะนิ่งเป็นเวลา 10 วัน พบไอโซเลต AJ605 สามารถผลิตกรดทั้งหมด (ร้อยละกรดอะซิติก) ได้สูงสุดร้อยละ 1.32±0.05 รองลงมาเป็น ไอโซเลต AJ809 AC202 ผลิตได้ร้อยละ 1.18±0.03 และ 1.07±0.05 ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 4.6 และรูปที่ 4.5 ไอโซเลต AJ605 สามารถผลิตกรดได้ปริมาณสูงสุดซึ่งสูงกว่าการทดลองของสนธิรัตน์และคณะ (2559) ซึ่งได้ศึกษาการคัดแยกแบคทีเรียอะซิติกในคอมบูชาจากชาเขียวและทดสอบความสามารถในการผลิตกรด พบว่าแบคทีเรียอะซิติกที่แยกได้ผลิตกรดได้ 3.67-9.31 กรัมต่อลิตรหรือ

ร้อยละ 0.37-0.93 ปฏิญญาและสกุณณี (2560) คัดแยกแบคทีเรียอะซิติกจากหัวเชื้อคอมบูชาจากโรงงานและน้ำหมักผลไม้ พบว่าไอโซเลต K3-13 สามารถผลิตกรดอะซิติกได้สูงสุด 7.44 กรัมต่อลิตร (ร้อยละ 0.74 โดยปริมาตร) ปริมาณกรดที่ผลิตได้จากการทดลองนี้ใกล้เคียงกับงานวิจัยของ กุลวดี (2552) ซึ่งได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียอะซิติกจากตัวอย่างผลไม้ 7 ชนิด ไอโซเลตที่ 37 สามารถผลิตกรดได้สูง 13.53 กรัมต่อลิตรหรือร้อยละ 1.35 โดยปริมาตร

ตารางที่ 4.6 ปริมาณกรดทั้งหมด(ร้อยละกรดอะซิติก) ที่ผลิตได้จากไอโซเลตแบคทีเรียอะซิติกในชาอู่หลง หมักในสภาวะนิ่ง อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสนาน 10 วัน

ไอโซเลตแบคทีเรียอะซิติก	ปริมาณกรดทั้งหมด (ร้อยละกรดอะซิติก)
AJ605	1.32± 0.05 [a]
AJ809	1.18± 0.03 [b]
AC202	1.07± 0.05 [c]
AC210	0.89 ± 0.03 [d]
AC403	0.79 ± 0.01 [de]
AC1001	0.69± 0.08 [ef]
AJ803	0.69± 0.01 [ef]
AC211	0.63± 0.23 [fg]
AN609	0.63± 0.01 [fg]
AN402	0.63± 0.01 [fg]

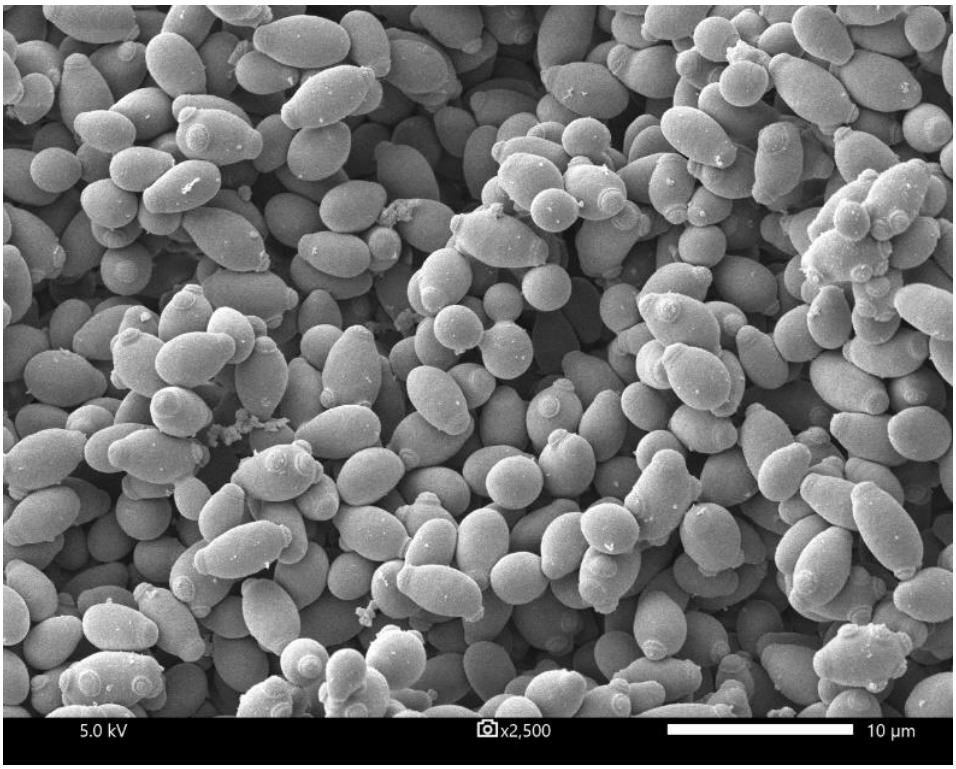
หมายเหตุ - ปริมาณกรด (ร้อยละกรดอะซิติก) แสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

- [abcd] ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมันร้อยละ 95

4.4 การจัดจำแนกสายพันธุ์ของยีสต์

ยีสต์ที่ใช้ในการจัดจำแนกได้แก่ YN403, YN3 และYN204 มีความสามารถในการผลิตแอลกอฮอล์และทนกรดได้สูงในชาอู่หลงที่มีพีเอชเท่ากับ 3.0 เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยดูรูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าไอโซเลต YN3 เซลล์มีรูปร่างเป็นรูปไข่ ไอโซเลต YN204 เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อน และมีการสืบพันธุ์แบบ Fission ไม่พบการแตกหน่อ และไอโซเลต YN403 เซลล์มีรูปร่างเป็นรูปไข่ มีการแตกหน่อ

ผลการทดสอบทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี แสดงดังตารางที่ 4.7 พบว่า ไอโซเลต YN3 มีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน ได้แก่ Glucose, 2-Keto-D-gluconate, Sorbitol, Inositol, และ Methyl-**α**-D-Glucopyranoside โดยผลการทดสอบทางชีวเคมีพบว่าใกล้เคียงกับ *Candida ethanolica* (Kurtzman *et al*., 2011) ไอโซเลต YN204 สามารถหมักน้ำตาล D-Glucose, Sucrose, Maltose และ Raffinose ได้ และมีความสามารถในการใช้สารประกอบคาร์บอนได้แก่ Glucose, Glycerol, 2-Keto-D-gluconate, Methyl-**α**-D-Glucopyranoside, D-Maltose, Sucrose และ D-Raffinose ผลการทดสอบพบว่าใกล้เคียงกับ *Schizosaccharomyces pombe* (Kurtzman *et al*., 2011) และไอโซเลต์ YN403 มีความสามารถในการหมักน้ำตาล Glucose และ sucrose ได้ และมีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนได้แก่ Glucose, Glycerol, 2-Keto-D-gluconate, Adonital (Ribitol), D-Galactose, Sorbitol, Inositol, Methyl-**α**-D-Glucopyranoside, Sucrose และ D-Trehalose ผลการทดสอบพบว่าใกล้เคียงกับ *Zygosaccharomyces bailii* (Kurtzman *et al*., 2011)



รูปที่ 4.4 รูปร่างเซลล์ *Zygosaccharomyces bailii* YN403 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (SEM) ที่กำลังขยาย 2,500 เท่า

จากการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลต YN3 YN204 และYN403 ที่ตำแหน่ง ITS region ด้วยไพร์เมอร์ ITS1 และ ITS4 ของยีสต์ และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม BLASTN (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) เพื่อระบุชนิดของยีสต์ โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank พบว่า ไอโซเลต YN3 มีความคล้ายคลึงกับ *Candida ethanolica* โดยมีความเหมือนร้อยละ 99.25 ไอโซเลต YN204 มีความคล้ายคลึงกับ *Schizosaccharomyces pombe* มีความเหมือนร้อยละ 84.10 และไอโซเลต YN403 มีความคล้ายคลึงกับ *Zygosaccharomyces bailii* มีความเหมือนร้อยละ 89.22 แสดงดังตารางที่ 4.8 ในการเปรียบเทียบเชิงวิวัฒนาการของยีสต์ที่คัดแยกได้พบว่ายีสต์ทั้ง 3 แสดงความสัมพันธ์ดังรูปที่ 4.7 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS region ด้วยโปรแกรม MEGA6 โดยใช้แบบจำลองแผนภูมิ Neighbor-joining และวิเคราะห์แผนภูมิด้วยวิธี Kimura 2-parameter พบว่าระยะห่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.05

การเปรียบเทียบความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีสต์ที่คัดแยกได้ทั้ง 3 ไอโซเลตพบว่าเป็น *Candida ethanolica, Schizosaccharomyces pombe* และ *Zygosaccharomyces bailii* พบว่ามีความแตกต่างกันของพันธุกรรมที่ชัดเจน คือ แบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ *Z.bailii* และ *S. pombe* ยีสต์ *Zygosaccharomyces* เป็นยีสต์เซลล์เดี่ยว ได้แก่ *Zygosaccharomyces bailii, Z. bisporus, Z. kombuchaensis, Z. lentus, Z. mellis* และ*Z. rouxii* (James and Stratford, 2011) เป็นยีสต์ที่ไม่มีการสร้าง True hyphae *Z.bailii* สามารถใช้และหมักน้ำตาลซูโครสได้ เจริญได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสแตกต่างจากสปีชีย์อื่นในกลุ่มเดียวกัน ซึ่งยีสต์ S*chizosaccharomyces* มีการจัดจำแนกเป็น 4 สปีชีย์ ได้แก่ *S. octosporus*, *S. japonicus*, *S. pombe* และ *S. cryophilus* โดยอาศัยความแตกต่างของการสร้าง True hyphae จำนวนสปอร์ใน Ascus และความสามารถในการใช้น้ำตาลซูโครส แรฟฟิโนสและ D-gluconate เป็นแหล่งคาร์บอนในการจำแนกเชื้อระดับสปีชีย์ *S. pombe* สามารถใช้และหมักน้ำตาลซูโครส แรฟฟิโนส และ D-gluconate และมี 4 Ascospores ใน 1 Ascus (Vaughan-Martini and Martini, 2011)

ตารางที่ 4.7 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของยีสต์ที่แยกได้จากกระบวนการหมักคอมบูชา

คุณสมบัติทางชีวเคมี	ไอโซเลต			*Zygosaccharomyces bailii*	*Candida ethanolica*	*Schizosaccharomyces pombe*
	YN403	YN3	YN204			
ความสามารถในการหมักน้ำตาล						
D-Glucose	+	-	+	+	s/-	+
D-Galactose	-	-	-	-	-	-
Sucrose	+	-	+	V	-	+
Maltose	-	-	+	-	-	V
Lactose	-	-	-	-	-	-
Raffinose	-	-	+	-	-	V
Trehalose	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-
ความสามารถในการใช้สารประกอบคาร์บอน						
Glucose	+	+	+	+	+	+
Glycerol	+	-	+	+/w	-	V
2-Keto-D-gluconate	+	+	+	n/d	n/d	n/d
L-Arabinose	-	-	-	-	-	-
D-xylose	-	-	-	-	-	-
Adonital (Ribitol)	+	-	-	V	-	-
D-Galactose	+	-	-	V	-	-
Sorbitol	+	+	-	n/d	n/d	n/d
Inositol	+	+	-	n/d	n/d	n/d
Methyl-α-D-Glucopyranoside	+	+	+	n/d	n/d	n/d
N-Acetyl-Glucosamine	-	-	-	-	-	-
D-Cellobiose	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ + = ผลบวก, - = ผลลบ, n/d = ไม่ได้ทดสอบ, V = Variable

ที่มา : Kurtzman *et al.,* (2011)

ตารางที่ 4.7(ต่อ) ผลการทดสอบทางชีวเคมีของยีสต์ที่แยกได้จากกระบวนการหมักคอมบูชา

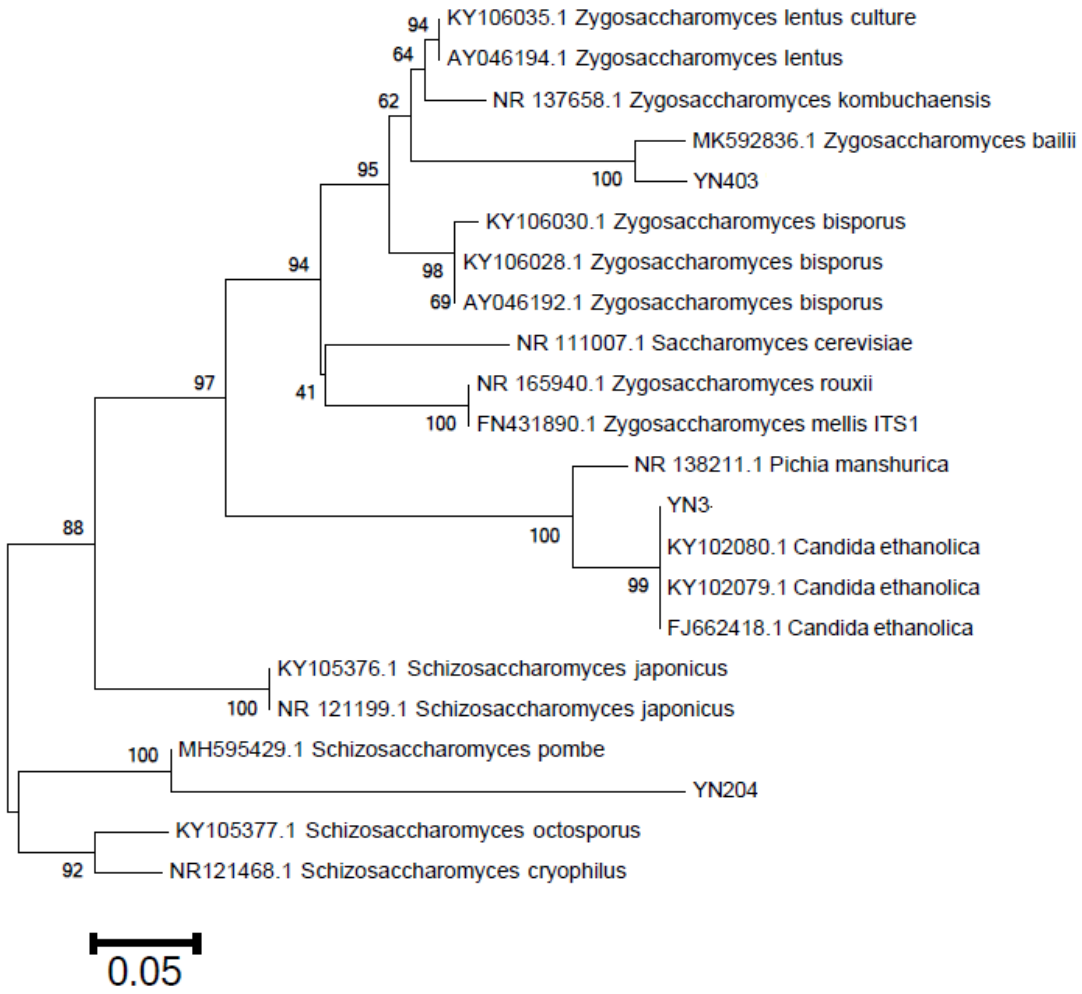
คุณสมบัติทางชีวเคมี	ไอโซเลต			*Zygosaccharomyces bailii*	*Candida ethanolica*	*Schizosaccharomyces pombe*
	YN403	YN3	YN204			
ความสามารถในการใช้สารประกอบคาร์บอน						
D-Lactose	-	-	-	-	-	-
D-Maltose	-	-	+	-	-	V
Sucrose	+	-	+	V	-	+
D-Trehalose	+	-	-	+/w	-	-
D-Melezitose	-	-	-	-	-	-
D-Raffinose	-	-	+	-	-	+

หมายเหตุ + = ผลบวก, - = ผลลบ, n/d = ไม่ได้ทดสอบ, V = Variable

ที่มา : Kurtzman *et al.,* (2011)

ตารางที่ 4.8 การจัดจำแนกยีสต์บริเวณ ITS region

ไอโซเลต	**ชนิดของยีสต์**	**Identity (%)**
YN3	*Candida ethanolica*	99.25
YN204	*Schizosaccharomyces pombe*	84.10
YN403	*Zygosaccharomyces bailii*	89.22



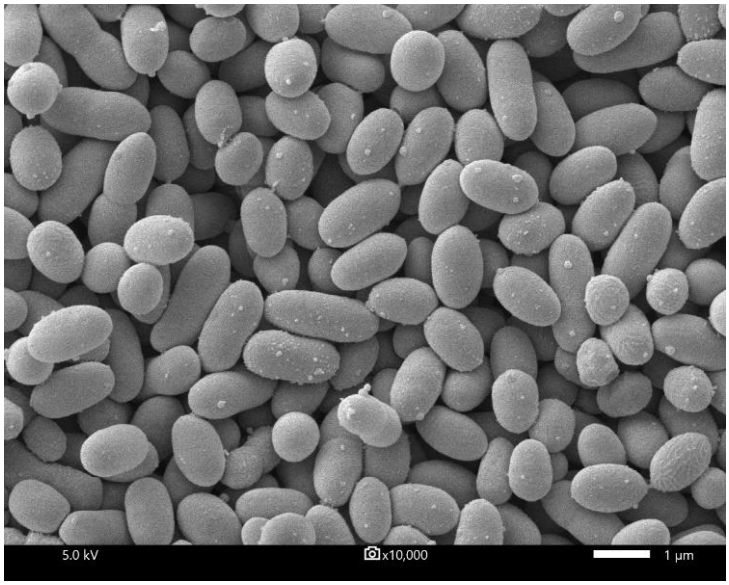
รูปที่ 4.5 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีสต์ในบริเวณ ITS region ด้วยวิธี Neighbor-joining ด้วยโปรแกรม MEGA6

Zygosaccharomyces bailii มีรูปร่างเซลล์เป็นรูปไข่ ไม่มีการเคลื่อนที่ มีการแตกหน่อ เป็นหนึ่งสปีชีส์ในสกุล *Zygosaccharomyces* การค้นพบครั้งแรกถูกตั้งชื่อเป็น *Saccharomyces bailii* โดย Lindner ในปี 1895 ต่อมาถูกจัดประเภทใหม่เป็น *Zygosaccharomyces bailii* (Barnett *et al*., 1983) พบในอาหารหมักดองที่มีความเป็นกรดและมีความเข้มข้นของน้ำตาลสูง (Thomas and Davenport, 1985) แหล่งที่มาของ *Z. bailii* สามารถแยกได้จาก น้ำผึ้ง น้ำผลไม้และน้ำผลไม้เข้มข้น องุ่น มายองเนส น้ำสลัด ผักดองหวาน น้ำส้มสายชู คอมบูชา ไวน์และน้ำอัดลม เป็นต้น (Barnett *et al*., 2000; Kurtzman, 1990; Thomas and Davenport, 1985) จากรายงานของ Tehmeena *et al.,* (2016) ศึกษาการคัดแยกเชื้อจากการหมักคอมบูชา โดยใช้อาหารที่เฉพาะกับยีสต์และแบคทีเรียอะซิติก จัดจำแนกโดยการทดสอบทางชีวเคมี และเทคนิคทางโมเลกุล พบ *Zygosaccharomysis bailli.* จากการคัดแยกยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตเอทานอลและทนกรด *Zygosaccharomyces bailii*

YN403 สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้สูงสุดร้อยละ 4.91±0.17 โดยปริมาตร และสามารถเจริญในอาหารชาอู่หลง โดยมีค่าการดูดกลืนแสง 1.28±0.03 จึงนำมาใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตคอมบูชา

4.5 การจัดจำแนกแบคทีเรียอะซิติก

การคัดแยกแบคทีเรียอะซิติกจากคอมบูชาทั้ง 3 แหล่งด้วยอาหาร GYC และ GEM agar โดยทำการเก็บโคโลนี นำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า ทั้ง 3 ไอโซเลต มีลักษณะเซลล์เป็นรูปท่อนสั้น ติดสีแกรมลบ จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวหรือเซลล์เดียวต่อกันเป็นเส้นสาย ลักษณะโคโลนีเป็นสีขาว ผิวหน้ามันวาว มีขอบเรียบ และไม่สร้างเซลลูโลส ในการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี พบว่า ทั้ง 3 ไอโซเลตมีการสร้างเอนไซม์ catalase ไม่มีการสร้างเอนไซม์ oxidase เมื่อทำการทดสอบการเกิด overoxidation คือปฏิกิริยาที่กรดอะซิติกถูกออกซิไดซ์ไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ โดยศึกษาจากการเปลี่ยนสีของอาหาร Carr medium พบว่าแบคทีเรียจีนัส *Acetobacter* sp. สามารถเปลี่ยนอาหารจากสีเขียวไปเป็นสีเหลือง และเปลี่ยนกลับมาเป็นสีเขียวอีกครั้งภายในระยะเวลา 14 วัน ซึ่งเป็นลักษณะเด่นของแบคทีเรียในจีนัส *Acetobacter* sp. แสดงดังตารางที่ 4.9



รูปที่ 4.6 รูปร่างเซลล์ของ *Acetobacter pasteurianus* AJ605 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (SEM) ที่กำลังขยาย 10,000 เท่า

จากการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียอะซิติกไอโซเลต AC202 AJ605 และ AJ809 ในยีนบริเวณ 16s rDNA ด้วยไพรเมอร์ 5’- ACCTGCGGCTGGATCACCTCC-3’ และทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม BLASTN พบว่า ไอโซเลต AC202 มีความคล้ายคลึงกับ *Acetobacter pasteurianus* โดยมีความเหมือนอยู่ในช่วงร้อยละ 97.55 ไอโซเลต AJ605 มีความคล้ายคลึงกับ *Acetobacter pasteurianus* โดยมีความเหมือนอยู่ในช่วงร้อยละ 98.04 และไอโซเลต AJ809 มีความคล้ายคลึงกับ *Acetobacter senegalensis* มีความเหมือนร้อยละ 98.02 แสดงดังตารางที่ 4.10

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16s rDNA ด้วยโปรแกรม MEGA6 โดยใช้แบบจำลองแผนภูมิ Neighbor-joining และวิเคราะห์แผนภูมิด้วยวิธี Kimura 2-parameter พบว่าระยะห่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.005 แสดงดังรูปที่ 4.9

ตารางที่ 4.9 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียอะซิติกที่แยกได้

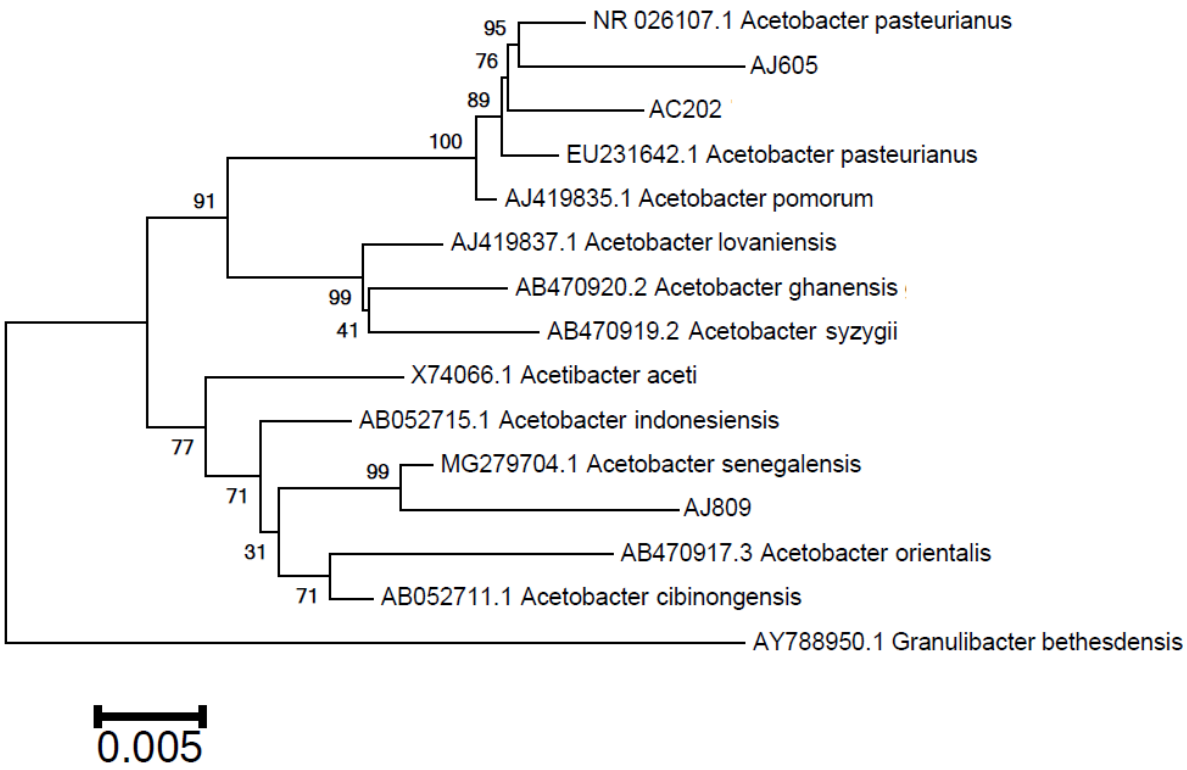
คุณสมบัติทางชีวเคมี	ไอโซเลต			
	AC202	AJ605	AJ809	*A. pasteurianus*
Gram strain	-	-	-	-
Catalase	+	+	+	+
Oxidase	-	-	-	-
Oxidation of acetate	+	+	+	+
Brown pigmentation on GYC	-	-	-	-
Carr medium	+	+	+	+

หมายเหตุ + = ผลบวก , - = ผลลบ

ที่มา : Liu *et al*., (1996)

ตารางที่ 4.10 การจัดจำแนกแบคทีเรียอะซิติกบริเวณ 16s rDNA

ไอโซเลต	ชนิดของแบคทีเรียอะซิติก	**Identity (%)**
AC202	*Acetobacter pasteurianus*	97.55
AJ605	*Acetobacter pasteurianus*	98.04
AJ809	*Acetobacter senegalensis*	98.02



รูปที่ 4.7 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแบคทีเรียอะซิติกที่คัดแยกได้ ด้วยวิธี Neighbor-joinong ด้วยโปรแกรม MEGA6

การเปรียบเทียบความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของแบคทีเรียอะซิติกทั้ง 3 ไอโซเลตที่แยกได้กับแบคทีเรียอะซิติกในจีนัส *Acetobacter* โดยใช้ *Granulibacter bethesdensis* เป็นแบคทีเรียอะซิติกเป็น Outgroup พบว่าความสัมพันธ์ของแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลตกับแบคทีเรีย Acetobacter มีความแตกต่างของพันธุกรรมที่ชัดเจน จากรูป 4.9 พบว่าแบคทีเรียในจีนัส *Acetobacter* แบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ *A. pasteurianus* และกลุ่ม *A.aceti* โดยมีลักษณะที่แตกต่างกันคือ *A.aceti* สามารถผลิตกรดได้จากเมทานอล ออกซิไดซ์น้ำตาลกลูโคสให้เป็น 2-keto-D-gluconic acid, 5-keto-D-gluconic acid และ 2,5-diketo-D-gluconic acid นอกจากนี้ยังสามารถผลิต Dihydroxyacetone จากกลีเซอรอลได้ ซึ่งคุณสมบัติที่กล่าวข้างต้นไม่พบใน *A. pasteurianus* (Yamada and Yukphan, 2008)

A. pasteurianus มีรูปร่างท่อนตรงหรือโค้งเล็กน้อย พบเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ หรือเรียงกันเป็นเส้นสาย ติดสีแกรมลบ ต้องการออกซิเจนในการเจริญ โคโลนีมีสีขาวสามารถออกซิไดซ์อะซิเตท และแลกเตท ไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำ *A. pasteurianus* อยู่ในไฟลัม Alpha-proteobacteria แฟมิลี่ *Acetobacteraceae* แบคทีเรียในสปีชีย์นี้เจริญได้ดีในแหล่งคาร์บอน คือ ethanol glycerol และ lactate สามารถสร้างกรดจาก *n*-propanol *n*-butanol และ D-glucose ไม่ย่อยแลกโตสและแป้ง อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญคือ 25-30 องศาเซลเซียส มีความสามารถในการเจริญเติบโตที่

ค่อนข้างต่ำที่ pH 3.0–3.5 และที่ระดับสารอาหารต่ำ แหล่งที่สามารถพบ *A. pasteurianus* สามารถพบได้ในธรรมชาติที่มีสภาพเป็นความเป็นกรดและมีปริมาณน้ำตาลหรือปริมาณแอลกอฮอล์ที่สูง อาทิเช่น ผลไม้ จำพวกองุ่น แอปเปิ้ล สับปะรด เงาะ มะม่วง ลิ้นจี่ ลำไย มะเฟือง มะนาว ละมุด ลูกพลับ สตรอเบอร์รี่ เบียร์ ไวน์ น้าส้มสายชู ชาหมักคอมบูชา น้ำผลไม้รสเปรี้ยว และน้ำผึ้ง (Dufresne and Farnmorth, 2000) จากรายงานของ Liu (1996) ทำการคัดแยกแบคทีเรียอะซิติกจากคอมบูชา ในประเทศไต้หวัน พบแบคทีเรียอะซิติก 2 ชนิด คือ *Acetobacter aceti* และ *Acetobacter pasteurianus A. pasteurianus* AJ605 ผลิตกรดทั้งหมด (ร้อยละกรดอะซิติก) ได้สูงสุดร้อยละ 1.32±0.05 ซึ่งสูงกว่าการทดลองของสนธิรัตน์และคณะ (2559) ซึ่งได้ศึกษาการคัดแยกแบคทีเรียอะซิติกในคอมบูชาจากชาเขียวและทดสอบความสามารถในการผลิตกรด พบว่าแบคทีเรียอะซิติกที่แยกได้ผลิตกรดได้ 3.67-9.31 กรัมต่อลิตรหรือร้อยละ 0.37-0.93 จึงนำ *A. pasteurianus* AJ605 มาใช้เป็นหัวเชื้อชาหมักคอมบูชา

4.6 ผลการศึกษาการหมักคอมบูชาด้วยอัตราส่วนผสมของยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกที่แยกได้

หมักคอมบูชาโดยใช้เชื้อยีสต์ *Zygosaccharomyces bailii* YN403 และแบคทีเรียอะซิติก *Acetobacter pasteurianus* AJ605 ใช้เป็นหัวเชื้อ โดยศึกษาอัตราส่วนผสมของยีสต์และแบคทีเรียอะซิติก ดังนี้ 3:7 4:6 5:5 6:4 และ 7:3 ปริมาตรต่อปริมาตร ใช้ปริมาณหัวเชื้อผสมร้อยละ 10 โดยปริมาตรของน้ำชา หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 21 วัน ศึกษาการเปลี่ยนแปลงระหว่างการหมัก ดังนี้

4.6.1 พีเอชและปริมาณกรดทั้งหมด (ร้อยละกรดอะซิติก)

จากการทดลองพบว่า การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของคอมบูชาที่ได้จากการใช้เชื้อผสมในอัตราส่วนต่างๆ จะลดลงตามระยะเวลาการหมัก ในวันแรกของการหมักตัวอย่างคอมบูชามี pH ใกล้เคียงกันอยู่ในช่วง 6.01±0.01 ถึง 6.20±0.01 และในวันที่ 21 ซึ่งเป็นวันสุดท้ายของการหมัก คอมบูชามีค่า pH อยู่ในช่วง 2.64±0.01 ถึง 2.69±0.00 แสดงในตารางที่ 4.11 และรูปที่ 4.10 ค่าพีเอชลดลงตามระยะเวลาการหมักเกิดจากยีสต์ในกระบวนการหมักผลิตเอทานอล จากนั้นแบคทีเรียกรดอะซิติกจะเปลี่ยนเอทานอลให้เป็นกรดอะซิติก ซึ่งทำให้ค่าพีเอชลดลงตามระยะเวลาการหมัก (Alejandra *et al*., 2019) ซึ่งค่าพีเอชจะสัมพันธ์กับปริมาณกรดทั้งหมด (ร้อยละกรดอะซิติก) ปริมาณกรดจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมัก ในวันที่ 21 ซึ่งเป็นวันสุดท้ายของการหมักมีปริมาณกรดอยู่ในช่วงร้อยละ 1.12±0.02 ถึง 1.35±0.01 สอดคล้องกับงานวิจัยของ Chakravorty *et al.,* (2016) ได้ศึกษาชนิดของจุลินทรีย์และคุณภาพทางชีวเคมีของคอมบูชาในระยะเวลาการหมัก 21 วัน พบว่าปริมาณกรดอะซิติกเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมักและสูงสุดในวันสุดท้ายของการหมัก จากผลการทดลอง คอมบูชาที่ใช้อัตราส่วนยีสต์ต่อแบคทีเรียเท่ากับ 4:6 จะมีปริมาณกรดทั้งหมดสูงสุดคือร้อยละ 1.35±0.01 รองลงมาเป็นการใช้อัตราส่วน 3:7 แสดงในตารางที่ 4.12 ซึ่งทั้งสองอัตราส่วนมีปริมาณแบคทีเรียอะซิติกมากกว่ายีสต์ ทำให้คอมบูชาที่ได้มีความเป็นกรดสูงกว่าอัตราส่วนอื่น สำหรับคอมบูชาที่ใช้หัวเชื้อทางการค้ามีปริมาณกรด

ทั้งหมด 1.12±0.02 ซึ่งต่ำกว่าการใช้เชื้อบริสุทธิ์ อาจเนื่องจากเชื้อแบคทีเรียะซิติกที่คัดเลือกมาใช้ในการหมักคือ A. *pasteurianus* AJ605 มีคุณสมบัติในการผลิตกรดทั้งหมด (ร้อยละกรดอะซิติก) ได้สูง ทำให้คอมบูชาที่ได้มีปริมาณกรดสูงกว่าการใช้หัวเชื้อคอมบูชาทางการค้า เมื่อนำมาหมักร่วมกันกับยีสต์การอยู่ร่วมกันของเชื้อผสมเหล่านี้จะส่งผลให้มีการผลิตกรดสูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Zhiwei *et al.*,(2010) ศึกษาการผลิตคอมบูชาจากชาดำโดยใช้เชื้อผสมระหว่างยีสต์และแบคทีเรียอะซิติก พบว่า ค่าพีเอชลดลงเหลือ 2.5 และสามารถผลิตกรดอะซิติกได้สูง 34.06 กรัมต่อลิตร (ร้อยละ 3.406) มีปริมาณกรดสูงกว่าการใช้หัวเชื้อทางการค้า

ตารางที่ 4.11 ค่าพีเอชของคอมบูชาจากชาอู่หลงหมักด้วยเชื้อผสมระหว่างยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 21 วัน

อัตราส่วนของยีสต์ต่อแบคทีเรียอะซิติก (มิลลิลิตร/มิลลิตร)	พีเอช				
	ระยะเวลาการหมัก (วัน)				
	0	7	10	14	21
3:7	$6.01\pm0.01^{d,A}$	$2.84\pm0.01^{e,B}$	$2.78\pm0.07^{e,C}$	$2.72\pm0.02^{d,D}$	$2.68\pm0.01^{ab,E}$
4:6	$6.10\pm0.01^{c,A}$	$2.93\pm0.01^{d,B}$	$2.78\pm0.02^{d,C}$	$2.86\pm0.00^{c,D}$	$2.66\pm0.02^{b,E}$
5:5	$6.14\pm0.03^{b,A}$	$3.14\pm0.01^{b,B}$	$3.01\pm0.01^{b,C}$	$2.87\pm0.03^{b,D}$	$2.69\pm0.01^{a,E}$
6:4	$6.20\pm0.01^{a,A}$	$3.00\pm0.04^{c,B}$	$2.90\pm0.01^{c,C}$	$2.86\pm0.01^{b,D}$	$2.69\pm0.00^{a,E}$
7:3	$6.18\pm0.05^{a,A}$	$3.00\pm0.01^{c,B}$	$2.90\pm0.07^{c,C}$	$2.87\pm0.00^{b,D}$	$2.64\pm0.01^{c,E}$
หัวเชื้อทางการค้า	$6.09\pm0.10^{c,A}$	$3.46\pm0.04^{a,B}$	$3.22\pm0.01^{a,C}$	$3.04\pm0.01^{a,D}$	$2.64\pm0.05^{c,E}$

หมายเหตุ - ค่าพีเอช แสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

- ^{abcd} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p\leq0.05$)
- ^{ABCD} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p\leq0.05$)

ตารางที่ 4.12 ปริมาณกรดทั้งหมด (ร้อยละกรดอะซิติก) ของคอมบูชาจากชาอู่หลง หมักด้วยยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกในอัตราส่วนต่างๆ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 21 วัน

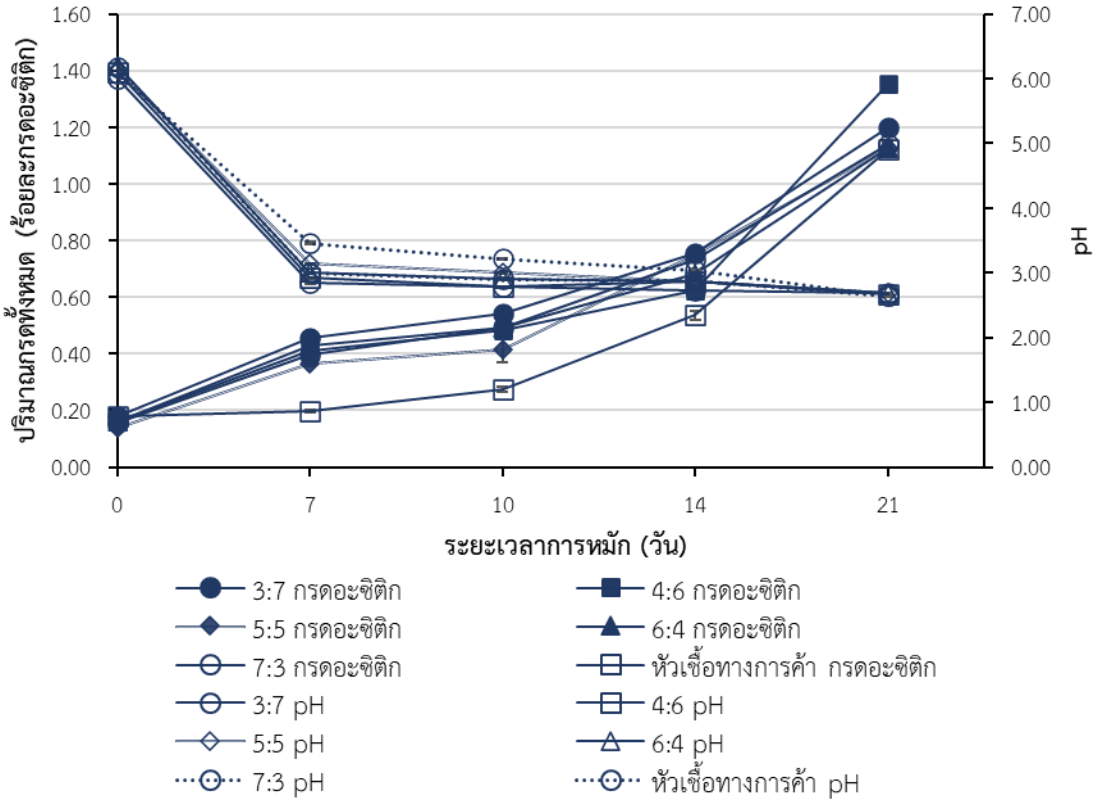
อัตราส่วนของยีสต์ต่อแบคทีเรียอะซิติก (มิลลิลิตร/มิลลิตร)	ปริมาณกรดทั้งหมด (ร้อยละกรดอะซิติก)				
	ระยะเวลาการหมัก (วัน)				
	0	7	10	14	21
3:7	$0.18\pm0.01^{ab,E}$	$0.46\pm0.00^{a,D}$	$0.54\pm0.01^{a,C}$	$0.76\pm0.00^{a,B}$	$1.20\pm0.01^{b,A}$
4:6	$0.16\pm0.01^{ab,E}$	$0.41\pm0.01^{bc,D}$	$0.49\pm0.01^{a,C}$	$0.62\pm0.01^{c,B}$	$1.35\pm0.01^{a,A}$
5:5	$0.14\pm0.00^{b,D}$	$0.36\pm0.00^{d,C}$	$0.42\pm0.04^{b,C}$	$0.75\pm0.02^{a,B}$	$1.13\pm0.01^{c,A}$
6:4	$0.16\pm0.01^{ab,E}$	$0.43\pm0.00^{ab,D}$	$0.49\pm0.02^{a,C}$	$0.68\pm0.01^{b,B}$	$1.13\pm0.02^{c,A}$
7:3	$0.16\pm0.01^{ab,E}$	$0.40\pm0.01^{cd,D}$	$0.49\pm0.01^{a,C}$	$0.73\pm0.00^{a,B}$	$1.14\pm0.02^{c,A}$
หัวเชื้อทางการค้า	$0.18\pm0.01^{a,D}$	$0.20\pm0.00^{d,D}$	$0.28\pm0.01^{c,C}$	$0.54\pm0.01^{d,B}$	$1.12\pm0.02^{c,A}$

หมายเหตุ - ปริมาณกรดทั้งหมด (ร้อยละอะซิติก) แสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานทำการทดลอง 3 ซ้ำ

- ^{abcd} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p\leq0.05$)
- ^{ABCD} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p\leq0.05$)

4.6.2 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

พบว่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจะลดลงตามระยะเวลาการหมัก ในช่วงแรกของการหมักปริมาณน้ำตาลทั้งหมดอยู่ในช่วง 103.21±0.02 ถึง 105.00±0.44 กรัมต่อลิตร โดยปริมาณน้ำตาลที่เหลือในแต่ละอัตราส่วนจะมีค่าใกล้เคียงกัน วันสุดท้ายของการหมัก (21 วัน) จะมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดอยู่ในช่วง 47.38±0.30 -49.05±0.11 กรัมต่อลิตร ซึ่งปริมาณน้ำตาลที่เหลือในคอมบูชาที่ใช้เชื้อบริสุทธิ์หมักในอัตราส่วนต่างๆ จะสูงกว่าการใช้หัวเชื้อทางการค้าเล็กน้อย โดยในวันสุดท้ายของการหมักคอมบูชาที่หมักด้วยหัวเชื้อทางการค้ามีปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 47.12±0.96 กรัมต่อลิตร เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับการหมักด้วยอัตราส่วนต่างๆ ($p>0.05$) การที่ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลดลงในระหว่างกระบวนการหมักเนื่องจากเชื้อยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกที่ใช้หมักคอมบูชาใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโต และใช้ผลิตแอลกอฮอล์รวมถึงกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ (Frank, 1995 ; Hobbs, 1995) แสดงดังตารางที่ 4.13 และรูปที่ 4.11

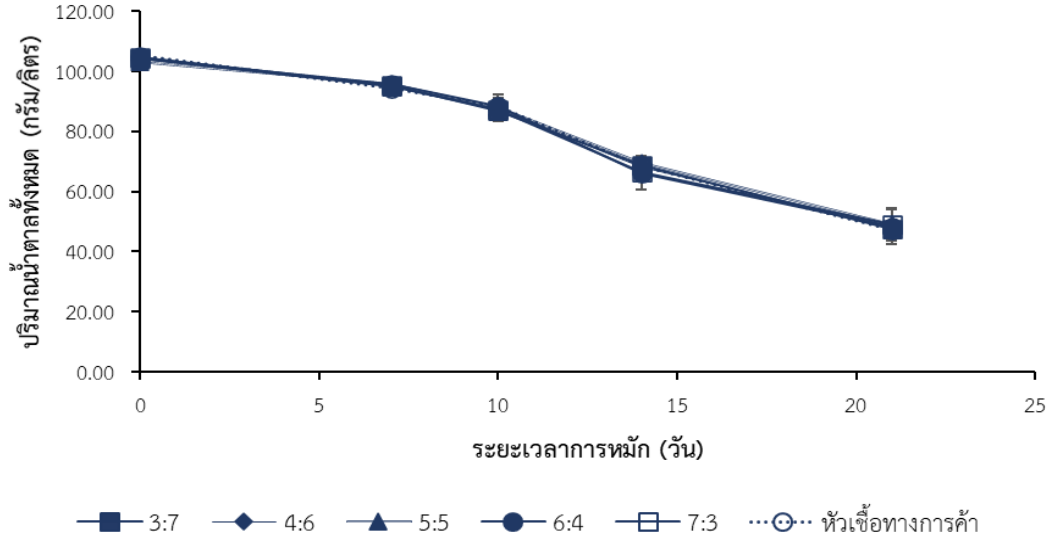


รูปที่ 4.8 การเปลี่ยนแปลงพีเอชและปริมาณกรดทั้งหมด (ร้อยละกรดอะซิติก) ระหว่างการหมักคอมบูชาด้วยยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกในอัตราส่วนต่างๆ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 21 วัน

ตารางที่ 4.13 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของคอมบูชาด้วยเชื้อบริสุทธิ์ของยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน หมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 21 วัน

อัตราส่วนของยีสต์ต่อแบคทีเรียอะซิติก (มิลลิลิตร/มิลลิตร)	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)				
	ระยะเวลาการหมัก (วัน)				
	0	7	10	14	21
3:7	104.80±0.84^{a,A}	95.20±0.10^{a,B}	86.94±0.83^{a,C}	68.81±0.85^{a,D}	47.38±0.30^{a,E}
4:6	105.00±0.44^{a,A}	95.26±0.23^{a,B}	87.28±0.47^{a,C}	67.96±0.04^{a,D}	48.50±0.45^{a,E}
5:5	103.21±0.02^{a,A}	95.89±0.18^{a,B}	87.86±0.71^{a,C}	69.64±0.17^{a,D}	49.05±0.11^{a,E}
6:4	104.34±0.76^{a,A}	95.61±0.88^{a,B}	88.23±0.24^{a,C}	66.19±0.17^{a,D}	48.20±0.29^{a,E}
7:3	104.34±0.13^{a,A}	95.10±0.55^{a,B}	87.35±0.77^{a,C}	66.29±0.23^{a,D}	48.91±0.29^{a,E}
หัวเชื้อทางการค้า	105.05±0.83^{a,A}	94.29±0.46^{a,B}	88.27±0.50^{a,C}	68.50±0.88^{a,D}	47.12±0.96^{a,E}

หมายเหตุ - ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด แสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ
- ^{abcd} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)
- ^{ABCD} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)



รูปที่ 4.9 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของคอมบูชาหมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์ของยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน หมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 21 วัน

4.6.3 ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด

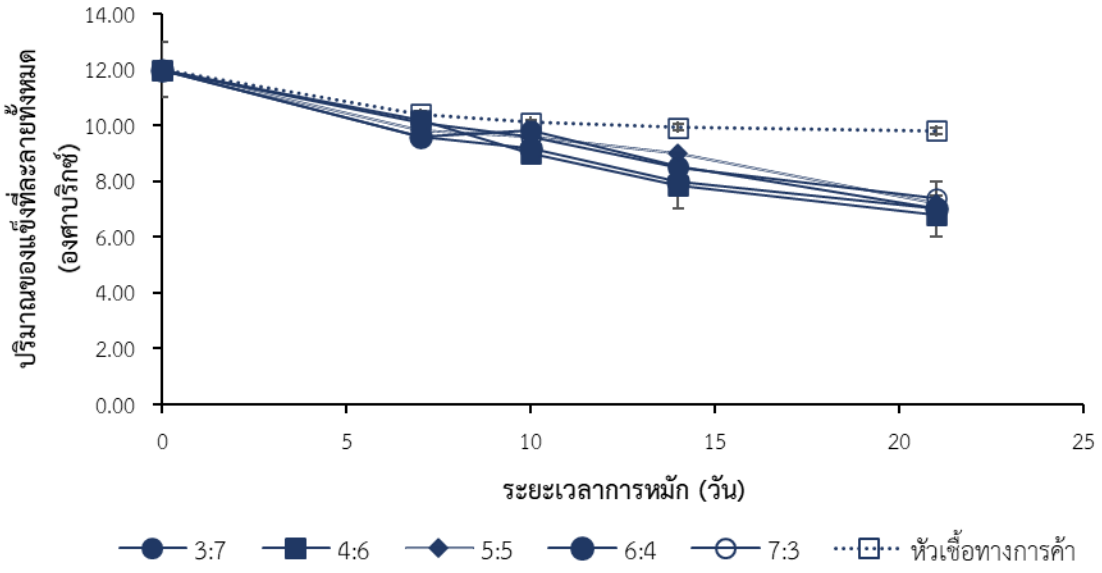
พบว่าปริมาณของแข็งที่ละลายทั้งหมดในวันที่ 0 ของการหมัก มีค่าใกล้เคียงกันอยู่ในช่วง 12 องศาบริกซ์ หลังจากนั้นปริมาณของแข็งที่ละลายได้จะมีแนวโน้มลดลงจนถึงวันสุดท้ายของการหมัก มีค่าอยู่ในช่วง 6.80±0.00 ถึง 9.80±0.00 องศาบริกซ์ ซึ่งปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดลดลงจะสัมพันธ์กับปริมาณแอลกอฮอล์ที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากจุลินทรีย์จะใช้น้ำตาลเปลี่ยนไปเป็นแอลกอฮอล์ภายใต้สภาวะไร้อากาศ ซึ่ง ปัณฑิตา (2542) รายงานว่า การเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสให้เป็นแอลกฮอล์ภายใต้สภาวะที่ปราศจากออกซิเจนจะผ่านวิถีของ Embden-Meyerhof-Parnas Pathway มีผลทำให้ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้จะลดลง แสดงดังตารางที่ 4.14 และรูปที่ 4.12

ตารางที่ 4.14 ปริมาณของแข็งที่ละลายทั้งหมดของคอมบูชาหมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์ของยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน หมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 21 วัน

อัตราส่วนของยีสต์ต่อแบคทีเรียอะซิติก (มิลลิลิตร/มิลลิตร)	ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (องศาบริกซ์)				
	ระยะเวลาการหมัก (วัน)				
	0	7	10	14	21
3:7	12.00±0.50^{a,A}	9.80±0.06^{d,B}	9.60±0.05^{b,BC}	8.53±0.11^{bc,C}	7.00±0.10^{b,D}
4:6	12.00±0.10^{a,A}	10.20±0.05^{b,B}	9.00±0.00^{e,C}	7.80±0.06^{c,D}	6.80±0.10^{b,E}
5:5	12.00±0.10^{a,A}	9.80±0.06^{c,B}	9.60±0.05^{c,B}	9.00±0.00^{b,B}	7.20±0.10^{b,C}
6:4	12.00±0.05^{a,A}	9.60±0.10^{d,B}	9.20±0.04^{d,AB}	8.00±0.05^{c,BC}	7.00±0.10^{b,C}
7:3	12.00±0.10^{a,A}	10.10±0.07^{a,B}	9.60±0.10^{d,B}	8.47±0.11^{bc,C}	7.40±0.14^{b,D}
หัวเชื้อทางการค้า	12.00±0.10^{a,A}	10.40±0.10^{a,B}	10.10±0.10^{a,B}	9.93±0.11^{a,B}	9.80±0.10^{a,B}

หมายเหตุ - ค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด แสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

- ^{abcd} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)
- ^{ABCD} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)



รูปที่ 4.10 การเปลี่ยนแปลงปริมาณของแข็งที่ละลายทั้งหมดของคอมบูชาหมักด้วยเชื้อยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน หมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 21 วัน

4.6.4 ปริมาณแอลกอฮอล์

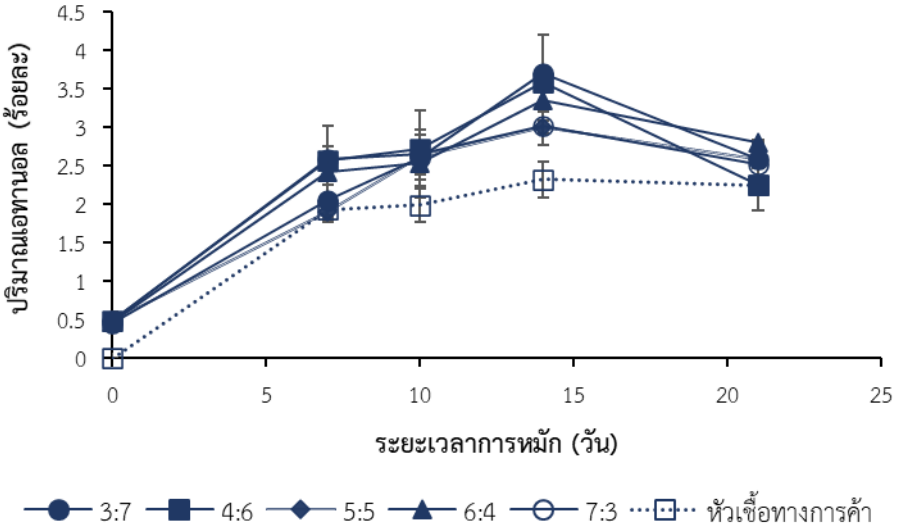
พบว่าปริมาณแอลกอฮอล์จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 7 วันแรกของการหมัก หลังจากนั้นจะเพิ่มอย่างช้าๆ และสูงสุดในวันที่ 14 หลังจากนั้นปริมาณแอลกอฮอล์จะลดลงเล็กน้อย Jayabalan *et al*., (2007) กล่าวว่า ปริมาณเอทานอลที่ตรวจพบในคอมบูชานั้นเกิดจากการหมักชากับน้ำตาลด้วยจุลินทรีย์ที่ทำงานร่วมกันคือ ยีสต์และแบคทีเรียอะซิติก โดยยีสต์จะใช้น้ำตาลในชาหมักเปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์ ซึ่งจะกระตุ้นการเจริญเติบโตของแบคทีเรียอะซิติกที่จะใช้แอลกอฮอล์เปลี่ยนเป็นกรดอะซิติก การใช้อัตราส่วนผสมของยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกในอัตราส่วนต่างๆ ปริมาณแอลกอฮอล์ที่ผลิตได้จะมีค่าใกล้เคียงกันอยู่ในช่วงร้อยละ 2.25±0.06 ถึง 2.80±0.01 และมีปริมาณสูงกว่าการใช้หัวเชื้อคอมบูชาทางการค้า ซึ่งมีปริมาณแอลกอฮอล์ในวันสุดท้ายร้อยละ 2.25±0.02 โดยปริมาตร แสดงดังตารางที่ 4.15 และรูปที่ 4.13

ตารางที่ 4.15 ปริมาณแอลกอฮอล์ระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชาด้วยเชื้อบริสุทธิ์ของยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน หมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 21 วัน

อัตราส่วนของยีสต์ต่อแบคทีเรียอะซิติก (มิลลิลิตร/มิลลิตร)	ปริมาณแอลกอฮอล์ (ร้อยละ)				
	ระยะเวลาการหมัก (วัน)				
	0	7	10	14	21
3:7	$0.45\pm0.03^{a,C}$	$2.05\pm0.11^{ab,B}$	$2.6\pm0.20^{a,B}$	$3.7\pm0.28^{a,A}$	$2.59\pm0.05^{ab,B}$
4:6	$0.48\pm0.07^{a,C}$	$2.56\pm0.26^{a,B}$	$2.71\pm0.29^{a,B}$	$3.58\pm0.04^{ab,A}$	$2.25\pm0.06^{b,B}$
5:5	$0.49\pm0.00^{a,D}$	$1.90\pm0.08^{b,C}$	$2.61\pm0.17^{a,B}$	$3.00\pm0.04^{c,A}$	$2.58\pm0.13^{ab,B}$
6:4	$0.47\pm0.01^{a,C}$	$2.42\pm0.34^{ab,B}$	$2.54\pm0.08^{a,B}$	$3.35\pm0.07^{bc,A}$	$2.80\pm0.01^{a,B}$
7:3	$0.48\pm0.03^{a,B}$	$2.58\pm0.08^{a,A}$	$2.65\pm0.32^{a,A}$	$3.01\pm0.14^{c,A}$	$2.51\pm0.03^{ab,A}$
หัวเชื้อทางการค้า	$0.00\pm0.00^{b,B}$	$1.93\pm0.08^{ab,A}$	$1.99\pm0.12^{a,A}$	$2.32\pm0.13^{d,A}$	$2.25\pm0.02^{b,A}$

หมายเหตุ - ปริมาณเอทานอล แสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

- ^{abcd} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p\leq0.05$)
- ^{ABCD} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p\leq0.05$)



รูปที่ 4.11 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอลกอฮอล์ระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชาด้วยเชื้อของยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน หมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 21 วัน

4.6.5 ผลการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งปฏิกริยาออกซิเดชัน ด้วยวิธี DPPH

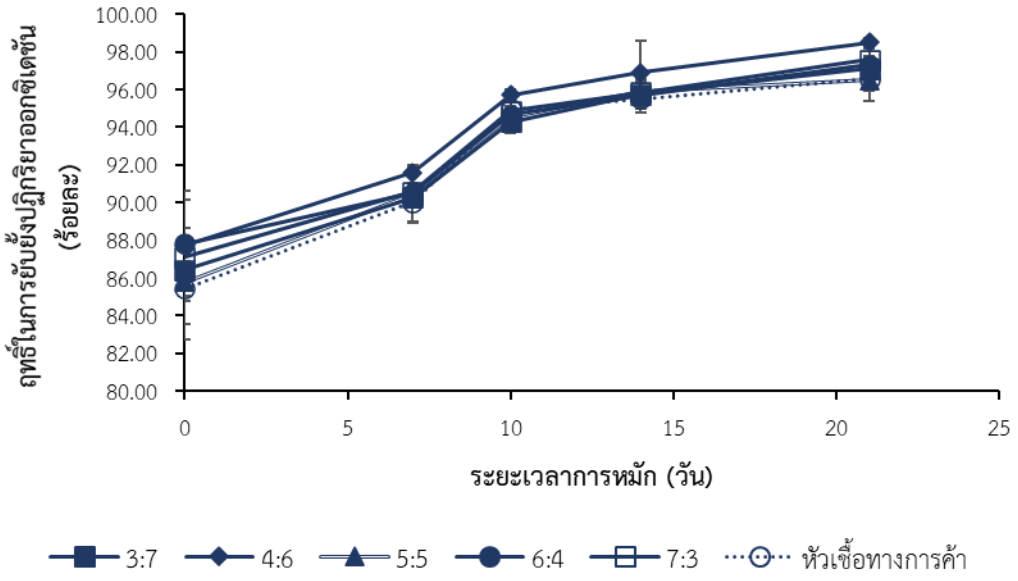
ฤทธิ์ในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 7-10 วัน โดยอัตราส่วน 4:6 มีฤทธิ์ในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันสูงที่สุดในวันที่ 10 คือร้อยละ 95.71±0.17 เมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น ฤทธิ์ในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันจะมีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจนถึงวันสุดท้ายของการหมัก (21 วัน) อัตราส่วนยีสต์ต่อแบคทีเรียอะซิติกที่ 4:6 มีฤทธิ์ในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันสูงสุด รองลงมาคือ 7:3 6:4 3:7 และ 5:5 เท่ากับร้อยละ 97.58±0.36, 97.32±0.26, 97.12±0.56 และ 96.48±0.33 ตามลำดับ แสดงในตารางที่ 4.16 และ รูปที่ 4.14 Jayabalan *et al.*, (2008) กล่าวว่าการต้านอนุมูลอิสระที่เพิ่มขึ้นในระหว่างการหมักคอมบูชาเกิดจากแบคทีเรียอะซิติกและยีสต์สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยหรือเปลี่ยนโครงสร้างโมเลกุลของสารประกอบโพลีฟีนอลในชาให้มีขนาดเล็กลงและเกิดโครงสร้างใหม่ อีกทั้งการหมักคอมบูชาจะให้สารประกอบอินทรีย์จำพวกกรดแอสคอบิก ซึ่งเป็นกลุ่มสารต้านอนุมูลอิสระชนิดหนึ่ง มีผลทำให้เครื่องดื่มคอมบูชามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น สำหรับคอมบูชาที่หมักด้วยหัวเชื้อคอมบูชาทางการค้ามีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH น้อยกว่าคอมบูชาที่หมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์ในอัตราส่วนต่างๆเล็กน้อย โดยในวันที่ 21 มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระร้อยละ 96.56±0.67 เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าการหมักคอมบูชาด้วยยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกในอัตราส่วนต่างๆ และหัวเชื้อทางการค้าฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระไม่แตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$)

ตารางที่ 4.16 ฤทธิ์ในการยับยั้งปฏิกริยาออกซิเดชัน ด้วยวิธี DPPH ของคอมบูชาด้วยเชื้อยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน หมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 21 วัน

อัตราส่วนของยีสต์ต่อแบคทีเรียอะซิติก (มิลลิลิตร/มิลลิตร)	ฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH (ร้อยละ)				
	ระยะเวลาการหมัก (วัน)				
	0	7	10	14	21
3:7	86.44±0.76^{a,D}	90.28±0.38^{ab,C}	94.27±0.39^{b,B}	95.73±0.28^{a,AB}	97.12±0.56^{ab,A}
4:6	87.73±0.53^{a,D}	91.60±0.14^{a,C}	95.71±0.17^{a,B}	96.91±0.96^{a,B}	98.51±0.14^{a,A}
5:5	85.77±0.26^{a,C}	90.49±0.32^{ab,B}	94.53±0.48^{b,A}	95.87±0.25^{a,A}	96.48±0.33^{b,A}
6:4	87.83±0.61^{a,B}	90.51±0.86^{ab,B}	94.65±0.21^{ab,A}	95.68±0.50^{a,A}	97.32±0.26^{ab,A}
7:3	87.11±0.11^{a,E}	90.56±0.21^{ab,D}	94.87±0.15^{ab,C}	95.86±0.51^{a,B}	97.58±0.36^{ab,A}
หัวเชื้อทางการค้า	85.42±0.36^{a,D}	90.02±0.04^{b,C}	94.95±0.37^{ab,B}	95.52±0.18^{a,AB}	96.56±0.67^{b,A}

หมายเหตุ - ฤทธิ์ในการยับยั้งปฏิกริยาออกซิเดชัน แสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

- ^{abcd} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)
- ^{ABCD} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)



รูปที่ 4.12 การเปลี่ยนแปลงฤทธิ์ในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของคอมบูชาหมักด้วยเชื้อยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน หมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 21 วัน

4.6.6 การทดสอบทางประสาทสัมผัสของคอมบูชาหมักด้วยเชื้อยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน

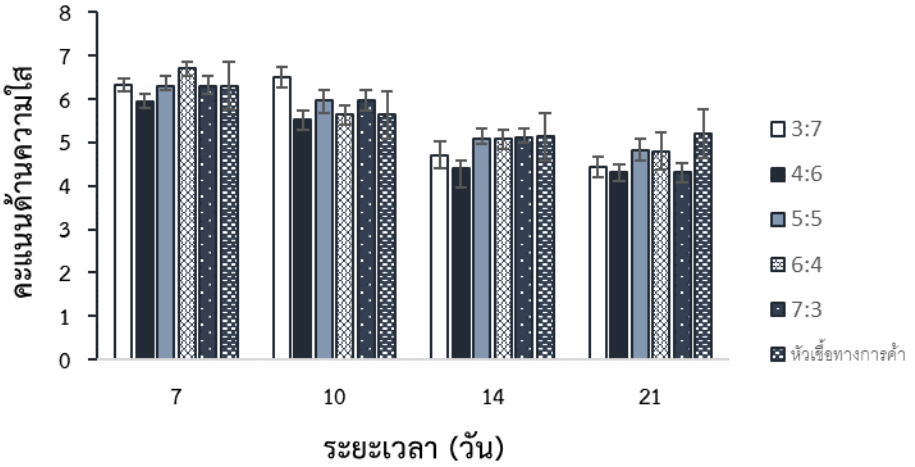
4.6.6.1 ความใส

จากการทดสอบทางประสาทสัมผัสของคอมบูชาด้วยเชื้อบริสุทธิ์ของยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน เมื่อพิจารณาคะแนนด้านความใส พบว่าคอมบูชาทุกอัตราส่วนมีคะแนนด้านความใสลดลงเมื่อระยะเวลาการหมักนานขึ้น จากการใช้อัตราส่วนยีสต์ต่อแบคทีเรียอะซิติกในอัตราส่วนต่างๆ พบว่าอัตราส่วน 4:6 มีคะแนนด้านความใสสูงกว่าอัตราส่วนอื่น เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) คอมบูชาที่หมักด้วยหัวเชื้อทางการค้ามีคะแนนด้านความใสสูงกว่าการหมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์อัตราส่วนต่างๆ แสดงดังตารางที่ 4.17 และรูปที่ 4.13

ตารางที่ 4.17 การทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านความใสของคอมบูชาหมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์ของยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกที่แยกได้ในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน หมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 21 วัน

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	ทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านความใส					
	อัตราส่วนยีสต์ต่อแบคทีเรียอะซิติก					
	3:7	4:6	5:5	6:4	7:3	หัวเชื้อทางการค้า
7	$7.30\pm0.22^{a,A}$	$7.27\pm0.28^{a,A}$	$7.13\pm0.23^{a,A}$	$7.08\pm0.23^{a,A}$	$7.17\pm0.19^{a,A}$	$7.17\pm0.24^{a,A}$
10	$6.86\pm0.13^{a,AB}$	$7.00\pm0.18^{a,AB}$	$6.83\pm0.23^{a,AB}$	$6.70\pm0.26^{a,AB}$	$6.93\pm0.23^{a,A}$	$7.10\pm0.32^{a,A}$
14	$6.73\pm0.23^{a,AB}$	$6.73\pm0.28^{a,AB}$	$6.93\pm0.24^{a,AB}$	$6.53\pm0.27^{a,AB}$	$6.53\pm0.33^{a,A}$	$7.00\pm0.25^{a,A}$
21	$6.50\pm0.25^{a,B}$	$6.50\pm0.23^{a,B}$	$6.30\pm0.26^{a,B}$	$6.10\pm0.22^{a,B}$	$4.86\pm0.27^{b,B}$	$6.53\pm0.21^{a,A}$

หมายเหตุ
- คะแนนความพึงพอใจในการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านความใสแสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ทำการทดลอง 30 ซ้ำ
- ^{abc} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p\leq0.05$)
- ^{ABC} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p\leq0.05$)



รูปที่ 4.13 การทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านความใสของคอมบูชาหมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์ของยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกที่แยกได้ในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน หมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 21 วัน

4.6.6.2 สี

เมื่อพิจารณาคะแนนความชอบด้านสีของคอมบูชาที่ใช้เชื้อบริสุทธิ์อัตราส่วนต่างๆ พบว่าคอมบูชาที่หมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์ทุกอัตราส่วน เมื่อระยะเวลาการหมักนานขึ้น คะแนนด้านสีจะลดลง สีที่เข้มขึ้นทำให้ผู้ทดสอบไม่ชอบ และไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) แสดงดังตารางที่ 4.18 และรูปที่ 4.14

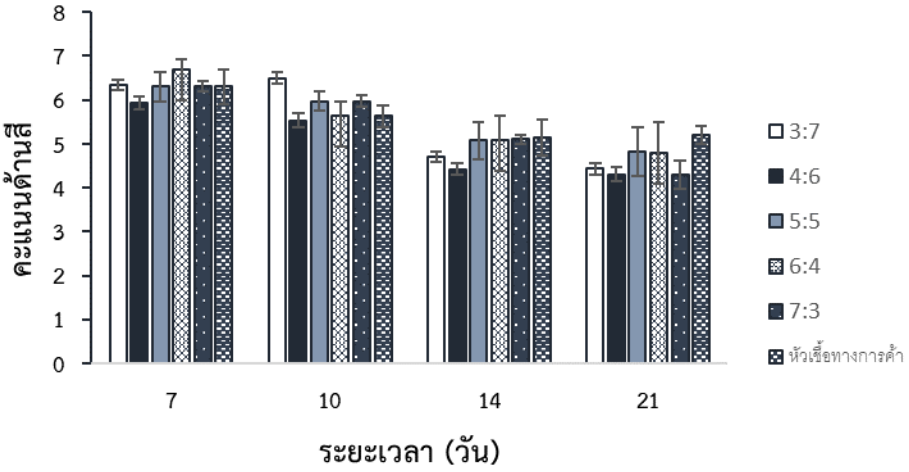
ตารางที่ 4.18 การทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านสีของคอมบูชาหมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์ของยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกที่แยกได้ในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน หมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 21 วัน

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	ทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านสี					
	อัตราส่วนยีสต์ต่อแบคทีเรียอะซิติก					
	3:7	4:6	5:5	6:4	7:3	หัวเชื้อทางการค้า
7	$6.83\pm0.18^{a,A}$	$6.67\pm0.19^{a,A}$	$6.70\pm0.18^{a,AB}$	$6.60\pm0.19^{a,AB}$	$6.80\pm0.16^{a,A}$	$6.97\pm0.23^{a,A}$
10	$6.90\pm0.22^{a,A}$	$7.03\pm0.21^{a,A}$	$6.90\pm0.22^{a,A}$	$7.06\pm0.21^{a,A}$	$6.80\pm0.23^{a,A}$	$6.71\pm0.25^{b,A}$
14	$6.80\pm0.92^{a,AB}$	$6.53\pm0.29^{a,AB}$	$6.60\pm0.24^{a,AB}$	$6.50\pm0.24^{a,AB}$	$6.67\pm0.25^{a,A}$	$6.60\pm0.23^{a,AB}$
21	$6.27\pm0.01^{a,B}$	$6.43\pm0.01^{a,B}$	$6.13\pm0.26^{a,B}$	$6.10\pm0.23^{a,B}$	$6.03\pm0.30^{b,B}$	$6.50\pm0.23^{a,AB}$

หมายเหตุ - คะแนนความพึงพอใจในการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านสี แสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ทำการทดลอง 30 ซ้ำ

- ^{abc} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p\leq0.05$)

- ABC ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)



รูปที่ 4.14 การทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านสีของคอมบูชาหมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์ของยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกที่แยกได้ในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน หมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 21 วัน

4.6.6.3 กลิ่น

เมื่อพิจารณาคะแนนด้านกลิ่นของคอมบูชาจากการใช้ยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกอัตราส่วนต่างๆ พบว่าเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น คะแนนด้านกลิ่นของคอมบูชาจะมีค่าลดลงทุกอัตราส่วนโดยมีกลิ่นกรดเพิ่มขึ้น เมื่อพิจารณาการใช้อัตราส่วน 3:7 4:6 5:5 6:4 และ 7:3 คะแนนด้านกลิ่นไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) เมื่อพิจารณาระยะเวลาการหมัก พบว่าคอมบูชาที่หมักด้วยอัตราส่วนต่างๆ หมักเป็นเวลา 7 10 14 วัน มีคะแนนด้านกลิ่นไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) แต่คอมบูชาที่หมัก 7 วัน จะแตกต่างกับคอมบูชาที่หมักเป็นเวลา 21 วัน สำหรับคอมบูชาที่หมักด้วยหัวเชื้อทางการค้ามีคะแนนด้านกลิ่นน้อยกว่าการใช้เชื้อบริสุทธิ์หมักแต่ไม่แตกต่างทางสถิติ แสดงดังตารางที่ 4.19 และรูปที่ 4.15

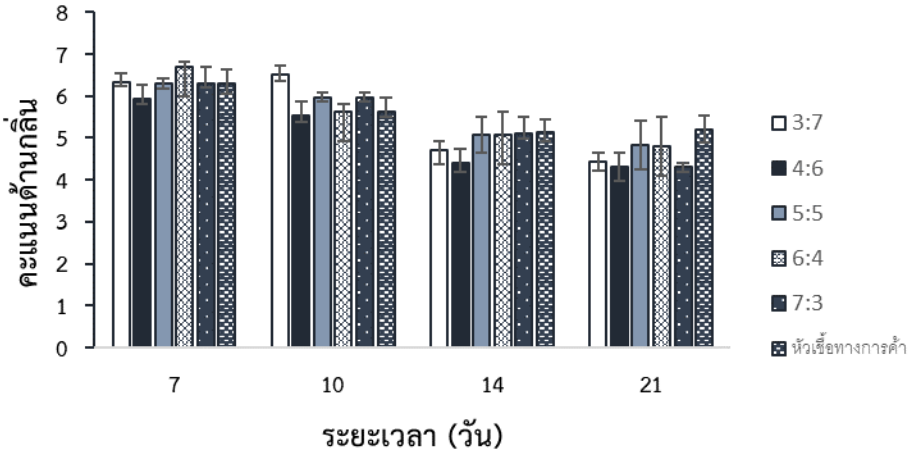
ตารางที่ 4.19 การทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นของคอมบูชาหมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์ของยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกที่แยกได้ในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน หมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 21 วัน

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	ทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่น					
	อัตราส่วนยีสต์ต่อแบคทีเรียอะซิติก					
	3:7	4:6	5:5	6:4	7:3	หัวเชื้อทางการค้า
7	^{a,A}6.23±0.27	^{a,A}6.07±0.28	^{a,A}5.93±0.29	^{a,A}6.13±0.27	^{a,A}6.30±0.28	^{a,A}5.77±0.33
10	^{a,AB}5.70±0.28	^{a,AB}5.27±0.27	^{a,A}5.70±0.27	^{a,AB}5.80±0.30	^{a,A}5.67±0.22	^{a,AB}5.37±0.35
14	^{a,AB}5.47±0.27	^{a,AB}5.27±0.33	^{a,A}5.37±0.28	^{a,AB}5.67±0.29	^{a,A}5.53±0.31	^{a,AB}4.77±0.32
21	^{a,B}5.30±0.31	^{a,B}5.17±0.30	^{a,A}5.30±0.35	^{a,B}5.17±0.32	^{a,B}4.57±0.32	^{a,B}4.63±0.38

หมายเหตุ - คะแนนความพึงพอใจในการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นแสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ทำการทดลอง 30 ซ้ำ

- ^{abc} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

- ^{ABC} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)



รูปที่ 4.15 การทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นของคอมบูชาหมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์ของยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกที่แยกได้ในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน หมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 21 วัน

4.6.6.4 รสชาติ

พบว่าเมื่อระยะเวลาการหมักนานขึ้น คะแนนด้านรสชาติของคอมบูชาทุกอัตราส่วนจะลดลงเนื่องจากคอมบูชามีรสชาติเปรี้ยวมาก เมื่อพิจารณาการหมักคอมบูชาด้วยเชื้อบริสุทธิ์ในอัตราส่วนต่างๆ พบว่าการหมักด้วยอัตราส่วน 6:4 มีคะแนนด้านรสชาติสูงกว่าการใช้อัตราส่วนอื่นๆ โดยเฉพาะในวันที่ 7 ของการหมักมีคะแนนด้านรสชาติสูงสุดเท่ากับ 6.70±0.28 สำหรับคอมบูชาที่หมักด้วยหัวเชื้อทางการค้าในวันที่ 7 และ 10 มีคะแนนด้านรสชาติน้อยกว่าคอมบูชาที่หมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์ แต่เมื่อเวลาการหมักเพิ่มขึ้นเป็น 14 และ 21 วัน จะมีคะแนนด้านรสชาติสูงกว่าคอมบูชาที่หมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์ แสดงดังตารางที่ 4.20 และรูปที่ 4.16

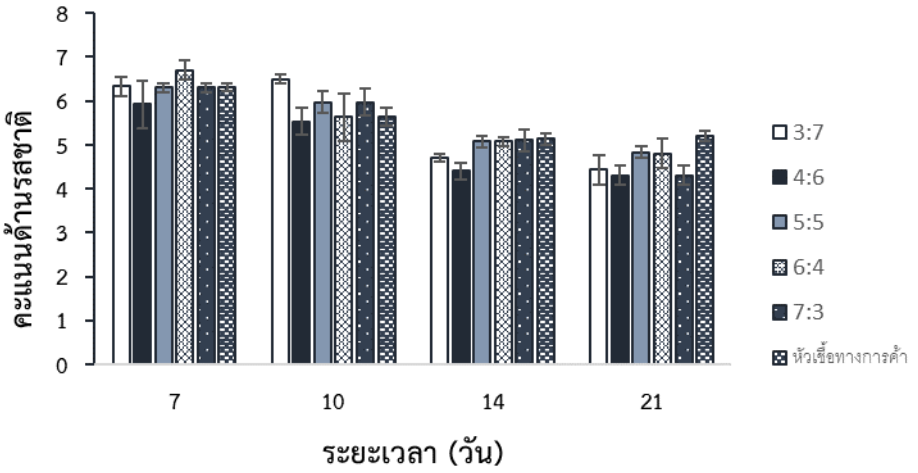
ตารางที่ 4.20 การทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านรสชาติของคอมบูชาหมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์ของยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกที่แยกได้ในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน หมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 21 วัน

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	ทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านรสชาติ					
	ชุดการทดลอง					
	3:7	4:6	5:5	6:4	7:3	หัวเชื้อทางการค้า
7	6.07±0.31^{ab,A}	5.63±0.26^{b,A}	6.30±0.26^{ab,A}	6.70±0.28^{a,A}	6.00±0.29^{ab,A}	6.03±0.32^{ab,A}
10	6.37±0.30^{a,A}	5.27±0.30^{b,A}	5.90±0.25^{ab,A}	5.33±0.44^{ab,B}	5.70±0.39^{ab,A}	5.57±0.36^{ab,AB}
14	3.80±0.35^{c,B}	4.07±0.15^{bc,B}	4.63±0.30^{ab,B}	4.93±0.41^{ab,B}	4.57±0.38^{ab,B}	5.07±0.36^{a,B}
21	3.77±0.32^{b,B}	3.76±0.18^{b,B}	4.33±0.35^{ab,B}	4.63±0.36^{ab,B}	4.13±0.42^{b,B}	5.23±0.31^{a,AB}

หมายเหตุ - คะแนนความพึงพอใจในการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านรสชาติแสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ทำการทดลอง 30 ซ้ำ

- ^{abc} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

- ^{ABC} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)



รูปที่ 4.16 การทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านรสชาติของคอมบูชาหมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์ของยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกที่แยกได้ในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน หมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 21 วัน

4.6.6.5 ความชอบโดยรวม

เมื่อพิจารณาความชอบโดยรวมของคอมบูชาที่หมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์ในอัตราส่วนต่างๆ แนวโน้มไปในทางเดียวกับรสชาติ คือ เมื่อพิจารณาการหมักคอมบูชาด้วยเชื้อบริสุทธิ์ในอัตราส่วนต่างๆ พบว่าการหมักด้วยอัตราส่วน 6:4 มีคะแนนด้านความชอบโดยรวมสูงกว่าการใช้อัตราส่วนอื่นๆ โดยเฉพาะในวันที่ 7 ของการหมักมีคะแนนด้านความชอบโดยรวมสูงสุดเท่ากับ 6.70±0.24 สำหรับคอมบูชาที่หมักด้วยหัวเชื้อทางการค้าในวันที่ 7 และ 10 มีคะแนนด้านความชอบโดยรวมน้อยกว่าคอมบูชาที่หมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์ แต่เมื่อเวลาการหมักเพิ่มขึ้นเป็น 14 และ 21 วัน จะมีคะแนนด้านความชอบโดยรวมสูงกว่าคอมบูชาที่หมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์ แสดงดังตารางที่ 4.21 และรูปที่ 4.17

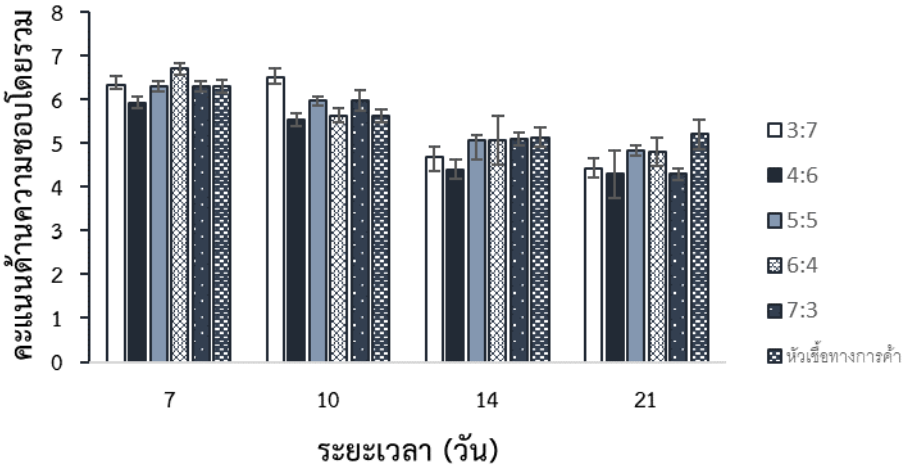
ตารางที่ 4.21 การทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านความชอบโดยรวมของคอมบูชาหมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์ของยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกที่แยกได้ในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน หมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 21 วัน

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	ทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านความชอบโดยรวม					
	อัตราส่วนยีสต์ต่อแบคทีเรียอะซิติก					
	3:7	4:6	5:5	6:4	7:3	หัวเชื้อทางการค้า
7	$6.33\pm0.25^{ab,A}$	$5.93\pm0.23^{b,A}$	$6.30\pm0.23^{ab,A}$	$6.70\pm0.24^{a,A}$	$6.30\pm0.23^{ab,A}$	$6.30\pm0.24^{ab,A}$
10	$6.50\pm0.28^{a,A}$	$5.53\pm0.28^{a,A}$	$5.97\pm0.24^{a,A}$	$5.63\pm0.38^{a,B}$	$5.97\pm0.34^{a,AB}$	$5.63\pm0.37^{a,AB}$
14	$4.70\pm0.31^{a,B}$	$4.40\pm0.33^{a,B}$	$5.07\pm0.32^{a,B}$	$5.07\pm0.36^{a,B}$	$5.10\pm0.33^{a,BC}$	$5.13\pm0.34^{a,AB}$
21	$4.43\pm0.33^{b,B}$	$4.30\pm0.32^{b,B}$	$4.83\pm0.35^{b,B}$	$4.80\pm0.37^{b,B}$	$4.30\pm0.36^{b,C}$	$5.20\pm0.29^{a,B}$

หมายเหตุ - คะแนนความพึงพอใจในการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านความชอบโดยรวม แสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ทำการทดลอง 30 ซ้ำ

- ^{abc} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p\leq0.05$)

- ^{ABC} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p\leq0.05$)



รูปที่ 4.17 การทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านความชอบโดยรวมของคอมบูชาหมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์ของยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกที่แยกได้ในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน หมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 21 วัน

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณของยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกในระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชาโดยใช้หัวเชื้อคอมบูชา 3 แหล่ง คือ จังหวัดนนทบุรี กรุงเทพมหานคร และเชียงใหม่ พบว่าปริมาณยีสต์จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและมีปริมาณสูงสุดในวันที่ 6 ของการหมัก โดยพบอยู่ในช่วง 7.83±0.01 – 7.85±0.01 logCFU/ml. หลังจากนั้นปริมาณยีสต์ลดลง สำหรับแบคทีเรียอะซิติกจากการหมักด้วยหัวเชื้อคอมบูชาทั้งสามแหล่ง ปริมาณแบคทีเรียอะซิติกจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและมีปริมาณสูงสุดในวันที่ 6 ของการหมัก หลังจากนั้นปริมาณแบคทีเรียจะลดลง

จากการคัดแยกยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกจากกระบวนการหมักคอมบูชา สามารถคัดแยกยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกได้อย่างละ 360 ไอโซเลต เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการผลิตแอลกอฮอล์และความสามารถในการทนกรดในอาหารชาอู่หลงที่ปรับพีเอชเท่ากับ 3.0 พบว่ายีสต์ไอโซเลต YN403 สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้สูงสุดร้อยละ 4.91±0.17 โดยปริมาตร รองลงมาเป็นโซเลต YN3, YN204, YN404 และ YC6 ซึ่งสามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้ร้อยละ 4.79±0.22, 4.63±0.29, 4.36±0.64 และ 4.34±0.61 ตามลำดับ ขณะเดียวกันยีสต์ไอโซเลต YN403 มีการเจริญในอาหารชาอู่หลงที่ปรับพีเอชเท่ากับ 3.0 ได้สูงกว่าไอโซเลตอื่นๆ จึงได้คัดเลือกยีสต์ไอโซเลต YN403 YN3 และYN204 มาใช้จัดจำแนกสายพันธุ์ของยีสต์โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การทดสอบทางชีวเคมี และจัดจำแนกด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลบริเวณ ITS region พบว่ายีสต์ไอโซเลต YN403 คล้ายคลึงกับ *Zygosaccharomyces bailii* ไอโซเลต YN3 คล้ายคลึงกับ *Candida ethanolica* และยีสต์ไอโซเลต YN204 คล้ายคลึงกับ *Schizosacharomyces pombe* สำหรับแบคทีเรียอะซิติก นำมาย้อมแกรม พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน 99 ไอโซเลต นำมาทดสอบความสามารถในการผลิตกรดในชาอู่หลง พบไอโซเลต AJ605 สามารถผลิตกรดทั้งหมด (ร้อยละกรดอะซิติก) ได้สูงสุดร้อยละ 1.32± 0.05 จึงนำแบคทีเรียอะซิติกไอโซเลต AJ605 นำมาจัดจำแนกสายพันธุ์ โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การทดสอบทางชีวเคมี และจัดจำแนกด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลด้วยเทคนิค 16S rDNA พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต AJ605 มีความคล้ายคลึงกับ *Acetobacter pasteurianus*

จากการนำยีสต์ *Z. bailii* YN403 และแบคทีเรียอะซิติก *A. pasteurianus* AJ605 มาใช้เป็นหัวเชื้อคอมบูชาโดยใช้อัตราส่วนของเชื้อทั้งสองในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน ดังนี้ *Z. bailii* YN403 ต่อ *A. pasteurianus* AJ605 เท่ากับ 3:7 4:6 5:5 6:4 และ 7:3 เปรียบเทียบกับหัวเชื้อคอมบูชาทางการค้า(จากจังหวัดนนทบุรี) หมักในสภาวะนิ่ง ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 21 วัน จากการศึกษาคุณภาพทางเคมีของคอมบูชาที่หมักด้วยเชื้อบริสุทธิในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน พบว่าคอมบูชาที่ได้มีค่าพีเอช ปริมาณกรดทั้งหมด(ร้อยละกรดอะซิติก) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณแอลกอฮอล์ รวมทั้งฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ใกล้เคียงกันและไม่มีความแตกต่างทางสถิติ และจากการทดสอบทางประสาทสัมผัสพบว่าการหมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์อัตราส่วนต่างๆ ไม่มีความแตกต่างกันมากนัก

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาอัตราส่วนของเชื้อยีสต์ *Z. bailii* YN403 และแบคทีเรียอะซิติก *A. pasteurianus* AJ605 ในอัตราส่วนต่างๆที่แตกต่างจากการศึกษาในครั้งนี้ เพื่อให้เห็นความแตกต่างทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของคอมบูชาที่ได้
2. ควรศึกษาชนิดของชาชนิดอื่น เช่น ชาดำ,ชาเขียว

เอกสารอ้างอิง

จันทราพร ทองเอกแก้ว. 2552. “ความหลากหลายของยีสต์ในป่าเบญจพรรณบริเวณอุทยานแห่งชาติภูจองนายอย ตรวจสอบโดยวิธีหาลำดับเบสบริเวณปลาย 5’ ของยีน 26s rDNA.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.

เจนจิรา จิรัมย์ และประสงค์ สีหานาม. 2554. “อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ : แหล่งที่มาและกลไกการเกิดปฏิกิริยา.” *วารสารวิชาการ มหาวิทยาลัยราชภัฏกาฬสินธุ์* 1(1): 59-70.

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

ธีรพงษ์ เทพกรณ์. 2555. “ชา : กระบวนการผลิต และองค์ประกอบทางเคมีจากการหมัก.” *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา.* 2 : 189-196.

บุหรัน พันธุ์สวรรค์. ไมตรี สุทธจิตต์ และ สุพักตร์ พ่วงบางโพ. 2553. “ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของกะทกรก ทองพันชั่ง ผักหวานป่าเพกา และมะระขี้นก ในพื้นที่มหาวิทยาลัยนเรศวร พะเยา.” รายงานวิจัย. มหาวิทยาลัยนเรศวรพะเยา. พะเยา. 34 น.

ปฏิญญา มั่นเกษตรกิจ และสกุลณี บวรสมบัติ. 2559. “การพัฒนาผลิตภัณฑ์คอมบูชาจากชาดำโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์.” การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับชาติและนานาชาติครั้งที่ 8. มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา. 1344-1353 น.

ปรียนันท์ บัวสด. 2549. “การตรวจสอบความสามารถในการเป็นสารแอนตี้ออกซิแดนท์ของเครื่องดื่มชาโดยวิธีไซคลิกโวลแทมเมตรี.” วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยศิลปากร. นครปฐม. 228 น.

พยุงศักดิ์ ตันติไพบูลย์วงศ์ และสุรศักดิ์ ใจเขียนดี. 2555. “*การวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลดีพีพีเอชและการฟอกสี อนุมูลเอบีทีเอส.*” คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา. บริษัท นพบุรีการพิมพ์ จำกัด. เชียงใหม่. 21-26 น.

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

วราวุฒิ ครูส่งและรุ่งนภา พงสวัสดิ์มานิต, 2532, เทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม,กรุงเทพฯ: โอเดียนโตร์, 209 น.

สาวิตรี ลิ่มทอง. 2549. **ยีสต์: ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ** พิมพ์ครั้งที่ 1 สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร.

สุนทร ตรีนันทวัน. 2556. ความรู้ทางด้านวิทยาสาสตร์และเทคโนโลยี. [online]. Available : http://edtech.ipst.ac.th/. สืบค้นเมื่อ 14 กันยายน 2561

อัญชนา เจนวิถีสุข . 2544. “การตรวจหาและบ่งชี้ชนิดสารต้านอนุมูลอิสระจากผักพื้นบ้านและสมุนไพรไทย.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

Ahmud S. R. and Hussein H. A., 2010. “Isolation and identification of yeast flora in local kombucha sample: AL NABTAH”. *Umm Al-Qura University Journal Applied Science.* 2(1):42-51.

Alejandra, S., Soto, V., Beaufort, S., Bouajila, J., Souchard, J., Taillandier, P. 2018. "Understanding kombucha tea fermentation: a review". *Journal of Food Science*. 83(3): 580-588.

Alia, M. 2009. "Effect of grape antioxidant dietary fiber on the total antioxidant capacity and the activity of liver antioxidant enzymes in rats." *Nutrition Research.* 23 : 1251-1267.

Ames, B.N., Shigenaga, M.K., and Hagen, T.M. 1993. "Oxidants, antioxidants, and the degenerative disease of aging." *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America.* USA. 90: 7915-7922.

Asai, T. 1968. **Acetic acid bacteria classification and biochemical activities**. University of Tokyo Press, Tokyo.

Battikh, H., Chieb, K., Bakhrouf, A., and Ammar, E. 2012. "Antibacterial and antifungal activities of black and green kombucha teas." *Journal of Food Biochemistry*. 37 : 231-236.

Barnett, J.A., Payne, R.W., and Yarrow, D. 2000. **Yeast : Characteristics and Identification**. 3rd edition. Cambridge University Press. Cambridge.

Davis, A.L., Lewis, J.R., Cai, Y., Powell, C., Davis, A.P., Wilkins, J.P.G., Pudney, P., and Clifford, M.N. 1997. "A polyphenolic pigment from black tea." *Phytochemistry. 46*, 1397-1402.

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

Eric, C., and Jessica, C. 2013. **Kombucha The amazing probiotic tea that cleanses, heals, energizers, and detoxifies.** USA: Penguin Group. New York.

Fernandez, P.L., Pablos, F., Martin, M.J., and Gonzales, A.G. 2002. "Study of catechin and xantine tea profiles as geographical tracers." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50 : 1833-1839.

Greenwalt, C.J. 1997. "Antibiotic activity of the fermented tea Kombucha." M.S. Thesis. Ithaca. NY: Cornell University.

Gupta, A., Singh, V. K., Qazi, G. N., and Kumar, A. 2001. "*Gluconobacter oxydans* : its biotechnological applications." *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 3 : 445-456.

Halliwell, B. 1999. "Antioxidant defense mechanism: From the beginning to the end." *Society for Free Radical Research International.* 31: 261-272.

Jayabalan, R., Marimuthu, S., and Swaminathan, K. 2007. "Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation." *Food Chemistry.* 102: 392-398.

Jayabalan, R., Marimuthu, S., Thangaraj, P., Sathishkumar, M., Binupriya, A.R., Swaminathan, K., and Yun, S.E. 2008. "Preservation of kombucha teas effect of temperature on tea components and free radical scavenging properties." *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 56. 9064–9071.

Jayabalan, R., Malbasa R.V., Loncar 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: 1541-4337.

Kallel, L., Desseaux, V., Hamdi, M., Stocker, P. and Hassan, E.A. 2012. "Insights into the fermentation biochemistry of Kombucha teas and potential impacts of Kombucha drinking on starch digestion. *Food Research International.* 49 : 226-232.

Kersters, K., Lisdiyanti, P., Komagata, K., and Swings, J. 2006. **The family *Acetobacteraceae*: the genera *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter* and *Kozakia*. The Prokaryotes** : 3rd ed., Vol. 5, Springer, New York.

Kurtzman, C.P., and Fell, J.W. 1996. **Yeast. In G.S. Hall (ed). Methods for the examination of organism diversity in soil and sediment.** CAB Internationnal Printed, UK.

Kurtzman, C.P., and Fell, J.W. 1998. **Definition, classification and nomenculture of the yeasts. In The Yeast. A Taxonomic study. 4 edition.** Elsevier,Amsterdam.

Kurtzman, C.P., Robnett, C.J., and Basehoar, P.B.. 2001. "*Zygosaccharomyces kombuchaensis,* a new ascosporogenous yeast from `Kombucha tea'." *FEMS Yeast Research.* 133-138.

Lee, V.S., Chen, C.R., Lio, Y.W., Tzen, J.T., and Chang, C.I. 2008. "Structural determination and DPPH radical-scavenging activity of two acylated flavonoid tetraglycosides in oolong tea (*Camellia sinensis*)." *Chemical and Pharmaceutical Bulletin.* 56: 851-853.

Lisdiyanti, P. , H. Kavasaki, Widyastuti, Y. , S. Saono, T. Seki, Y. Yamada, T.Uchimura and K.Komagata. 2002. *Kozakia baliensis* gen. Nov. , sp. Nov., a novel acetic acid bacteria in the Alpha -*proteobacteria* **International Journal of Systematic and Evolution Microbiol**. 52: 1-5.

Liu C. H., Hsu W.H.,Lee F.L. and Liao C.C.. 1996. “The isolation and identification of microbes from a fermented tea beverage, Haipao, and their interactions during Haipao fermentation.” *Food Microbiology***.** 13: 407–415

Matinee, M. 2011. **Yeast and yeast technology**. Department of Agro-Industry, Faculty of Agriculture, Ubon Ratchathani University.

Marsh, A. A., Stoycos, S. A., Brethel-Haurwitz, K. M., Robinson, P., VanMeter, J. W., & Cardinale, E. M. (2014). Neural and cognitive characteristics of extraordinary altruists. Proceedings of the National Academy of Sciences, 111(42): 15036-15041.

Nakase, T. 2001. “What is Yeasts? Lecture note for the workshop on Yeasts: classification, Identification, Preservation and Application.” Kasetsart University, Bangkok Thailand.

Nguyen, K. N., Phuong, B. N., Huong, T. N., and Phu, H. L. 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.” *Food Science and Technology.* 64 : 1149-1155.

Pokorny, J., Yanishlieva, N. and Gordon, M. 2001. **Antioxidants in Food: Practical Applications**. CRC Press. New York.

Que, F., Mao, L.C., and Zheng, X.J. 2006. “In vitro and vivo antioxidant activities of daylily flowers and the involvement of phenolic compounds.” *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*. 16 : 196-203.

Radomir, V. M., Eva, S. L., Jasmina, S. V., and Jasna, M. C. 2011. “Influence of starter cultures on the antioxidant activity of kombucha beverage.” *Food Chemistry*. 127: 1727-1731

Rains, T.M., Agarwal, S., and Maki, K.C. 2011. “Antiobesity effects of green tea catechins: a mechanistic review.” *Journal of Nutritional Biochemistry*. 22: 1-7.

Silva, L. R. , Cleewerck, L., Rivas, R., Swings, J., Trujillo, M.E., Willems, A., and Velazquez, E. 2006. “*Acetobacter oeni* sp. Nov., isolated from spoiled red wine.” *International Journal of Systematic and Evolutionnary Microbiology*. 56 : 21-24.

Shoji, Y., and Nakashima, H. 2006. “Glucose-lowering effect of powder formulation of African black tea extract in KK-A(y)/TaJcl diabetic mouse.” *Archives of Pharmacal Research.* 29 : 786-794.

Srihari, T., and Satyanarayana, U.. 2012. "Changes in free radical scavenging activity of Kombucha during fermentation". *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research.* 4(11):1978-1981.

Teoh, A.L., Heard, G., and Cox, J. 2004. "Yeast ecology of Kombucha fermentation." *International journal of Food Microbiology.* 95 : 119-126.

Tehmeena, A. M., Kapil, P., Sutita, D., Shashikant, P. V., and Abhay, S.C. 2016. "Isolation and characterization of bacteria and yeast from Kombucha tea. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences.* 5(6) : 32-41.

Thomas, D. S. and Davenport, R. R. 1985. "*Zygosaccharomyces bailii* – a profile of characteristics and spoilage activities". *Food Microbiology* 2, 157–169.

Van Der Walt, J.P., and Yarrow, D. 1984**. Method for the isolation, maintenance, classification and identification of yeast. In the yeast A Taxonomic Study.** 3rd edition**.** Elsevier. Amsterdam.

Vaughan-Martini, A., and Martini, A. 2011. *Schizosaccharomyces*. 780-784 In Kurtzman, P. Fell, J., and Boekhout, T. 2011. **The yeast**. 5nd ed. San diego : Elsevier.

Watanawana, M., Nilakshi, J., Candy, C. and Viduranga, Y. W. 2015. "Application of the kombucha 'tea fungus' for the enhancement of antioxidant and starch hydrolase Inhibitory properties of ten herbal teas". *Food Chemistry.* 304-311.

Yamada, Y., and Yukphan, P. 2008. "Genera and species in acetic acid bacteria." *International Journal of Food Microbiology.* 125 : 15-24.

Yong, W., Baoping, J., Wu, W., Wang, R., Yang, Z., Zhang, D., and Tian, W. 2013. "Hepatoprotective effects of kombucha tea: identification of functional strains and quantification of functional components." *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 94 : 265–272.

Yang, Z. W., Ji, P.B., Zhou, F., Li, B., Luo, Y., Yang, L., and Li, T. 2009. "Hypocholesterolaemic and antioxidant effects of Kombucha tea in high-cholesterol fed mice." *Science of Food and Agriculture.* 89: 150-156.

Yarrow, D. 1998. **Methods for the isolation, maintenance and identification of yeast. The yeast, a taxonomic study**. 4th ed. Elsevies. Amsterdam. The Netherlands.

Yuan, J.M., Sun, C., and Butler, L.M. 2011. "Tea and cancer prevention: Epidemiological studies." *Harmacological Research.* 64 : 123-135.

Yukphan, P., Malımas, T., Muramatsu, Y., Takahashı, M., Kaneyasu, M. and Tanasupawat, S. 2008. "*Tanticharoenia sakaeratensis* gen. nov., sp. nov., a new osmotolerant acetic acid bacterium in the **α**-Proteobacteria." *Bioscience Biotechnology Biochemistry*. 72 : 672-676.

Yukphan, P., Malımas, T., Muramatsu, Y., Takahashı, M., Kaneyasu, M. and Potacharoen, W. 2009. "*Ameyamaea chiangmaiensis* gen. nov., an acetic acid bacterium in the α-Proteobacteria." *Bioscience Biotechnology Biochemistry*. 73 : 2156-2162.

Zhiwei Yang, Feng Zhou, Baoping Ji, Bo Li, Yangchao Luo and Li Yang. 2010. Symbiosis between microorganisms from kombucha and kefir: potential significance to the enhancement of kombucha Function. *Appl Biochem Biotechnology*, 160, 446-455.

Zhou, H. , Lan, T. , Dien, B.S., Ronald. E.H., and Zhu, J.Y. 2014. "Comparisons of five *Saccharomyces cerevisiae* strains for ethanol production from SPORL-Pretreated Lodgepole Pine." *Biotechnology Progress.* 30:1076–1083.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Acidified PDA

ประกอบด้วย

Potato dextrose agar	24	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
สารละลายกรดทาร์ทาริกเข้มข้นร้อยละ	10	

วิธีเตรียม

ละลาย Potato dextrose agar ในน้ำกลั่น 1 ลิตร ให้ความร้อนเพื่อให้วุ้นละลาย นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมกรดทาร์ทาริกที่มีความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 1.85 มิลลิลิตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงในอาหาร PDA ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆเพื่อให้ส่วนผสมเข้ากัน

2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast extract Peptone Dextrose agar (YPD)

ประกอบด้วย

ยีสต์สกัด	10	กรัม
เปปโตน	10	กรัม
กลูโคส	20	กรัม
วุ้น	18	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ผสมส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน ให้ความร้อนเพื่อให้วุ้นละลาย นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3 อาหารเลี้ยงเชื้อ Glucose-Ethanol Medium (GEM)

ประกอบด้วย

ยีสต์สกัด	5	กรัม
กลูโคส	20	กรัม
เอทานอลร้อยละ 95	2.5	มิลลิลิตร
วุ้น	18	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ผสมส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกันยกเว้นเอทานอล ให้ความร้อนเพื่อให้วุ้นละลาย นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้อุณหภูมิลดลงประมาน 50 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมเอทานอลที่ผ่านการกรองเพื่อฆ่าเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

4 อาหารเลี้ยงเชื้อ Glucose yeast extract calcium carbonate medium (GYC)

ประกอบด้วย

ยีสต์สกัด	10	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต	20	กรัม
กลูโคส	20	กรัม
วุ้น	18	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ผสมส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน ให้ความร้อนเพื่อให้วุ้นละลาย นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5 อาหารเลี้ยงเชื้อ Glucose yeast extract (GY)

ประกอบด้วย

ยีสต์สกัด	10	กรัม
กลูโคส	20	กรัม
วุ้น	18	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ผสมส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน ให้ความร้อนเพื่อให้วุ้นละลาย นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6 อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB)

ประกอบด้วย

Nutrient broth	13	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ละลาย Nutrient broth ในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

7. อาหาร Fermentation basal medium

ประกอบด้วย

Yeast Extract	10	กรัม
Glucose	20	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

เติมสารละลาย Bromothymol blue ลงใน Fermentation basal medium แบ่งใส่หลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 150x16 มิลลิลิตร หลอดละ 2 มิลลิลิตร ภายในมีหลอดดักแก๊ส (Durham tube) ในลักษณะคว่ำหลอด นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลายน้ำตาลที่ต้องการทดสอบ ซึ่งทำให้ปราศจากเชื้อโดยการ

กรองผ่าน membrane filter ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อหลอด ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ยกเว้นน้ำตาลราฟฟิโนส ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก

8. อาหาร Christensen's urea agar

ประกอบด้วย

Peptone	1	กรัม
Glucose	1	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
KH_2PO_4	2	กรัม
Phenol red	0.012	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6.8 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก หรือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ แล้วเติมผงวุ้น 20 กรัมต่อลิตร ต้มจนวุ้นละลาย แบ่งใส่หลอดๆละ 4.5 มิลลิลิตร อุดจุกสาลีนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เติมสารละลายยูเรียที่มีความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ กรองด้วย membrane filter ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรต่อหลอด ผสมแล้วปล่อยให้แข็งในสภาพเอียง

9. อาหาร Yeast Extract–Peptone–Glycerol (YPG) Medium

ประกอบด้วย

ยีสต์สกัด	10	กรัม
กลีเซอรอล	20	มิลลิลิตร
เปปโตน	20	กรัม
วุ้น	20	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียม

ผสมส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน ให้ความร้อนเพื่อให้วุ้นละลาย นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

10. โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

โซเดียมไฮดรอกไซด์	4	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

11. ฟีนอล์ฟทาลีน

เตรียมโดยละลายฟีนอล์ฟทาลีน 0.5 กรัม ในเอทิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร

12. สารปฐมภูมิโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลต 0.1 โมลาร์

1. ชั่งโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลต (KPH) ที่ผ่านการอบที่ 70 องศาเซลเซียส นาน 1-2 ชั่วโมงทิ้งให้เย็นชั่งมา 2.0 กรัม

2. ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

13. สารละลาย 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ความเข้มข้น 0.25 มิลลิโมลาร์

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)	9.875	มิลลิกรัม
absolute ethanol	100	มิลลิลิตร

จากนั้นนำขวดที่บรรจุสารละลาย DPPH หุ้มด้วยฟรอยด์วางบนเครื่องกวนสารละลายเป็นเวลา 30 นาที

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ทางเคมีและเครื่องมือวิเคราะห์

1. การไทเทรตหาปริมาณกรดทั้งหมด(ร้อยละกรดอะซิติก) (AOAC, 2000)

1.1 หาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล

1. นำโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลตอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 1-2 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นใน Desiccator

2. เตรียมสารละลายโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยชั่งโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลตที่อบและเย็นแล้วประมาณ 2.0 กรัม

3. ละลายน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลตร ด้วยขวดปรับปริมาตร

4. ปิเปตสารละลายมาตรฐานปฐมภูมิโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ 20 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่

5. เติมฟีนอล์ฟทาลีน 1 % 2-3 หยด

6. ไตเตรทกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จนกระทั่งถึงจุดยุติเป็นสีชมพู

7. คำนวณหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

จากสูตร $(C_{NaOH})(V_{NaOH}) = (C_{KHP})(V_{KHP})$

ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่คำนวณได้ คือ 0.1020 N

1.2 ไทเทรตหาปริมาณกรดทั้งหมด(ร้อยละกรดอะซิติก)

1. บรรจุสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ลงในบิวเรต (ที่แห้งและสะอาด)

2. ปิเปตตัวอย่างอาหารหมัก ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์เจือจางด้วยน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร

3. หยดฟีนอล์ฟทาลีน 1% 3 หยด เขย่าให้เข้ากัน นำมาไทเทรตกับ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่อยู่ในบิวเรต ไทเทรตจนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพูถาวร

4. คำนวณหาปริมาณกรดทั้งหมด (ร้อยละโดยปริมาตรของกรดอะซิติก)

$$\text{ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติก (ร้อยละ)} = \frac{C \times V \times MW \times 100}{1000 \times \text{ปริมาตรของอาหารหมัก}}$$

C = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ (นอร์มอล)
V = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ (มิลลิลิตร)
MW = น้ำหนักโมเลกุลของกรดอะซิติก (60.025 กรัมต่อโมล)

2. การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี

วิธีเตรียมกราฟมาตรฐานเอทานอล

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานโพรพานอล (N-propanol) ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร เป็นสารละลายมาตรฐาน

2. เตรียมสารละลายมาตรฐานเอทานอลให้มีความเข้มข้นร้อยละ 4 6 8 10 และ 12 โดยปริมาตร

3. ใส่สารละลายมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นในขวดแก้วขนาด 2 มิลลิลิตร พร้อมปิดฝาขวด

4. การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลใช้เทคนิค แก๊สโครมาโตกราฟี (GC) โดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตรกราฟี (GC-2014, Shimadzu) ต่อกับ Auto Injector (AOC-20i)

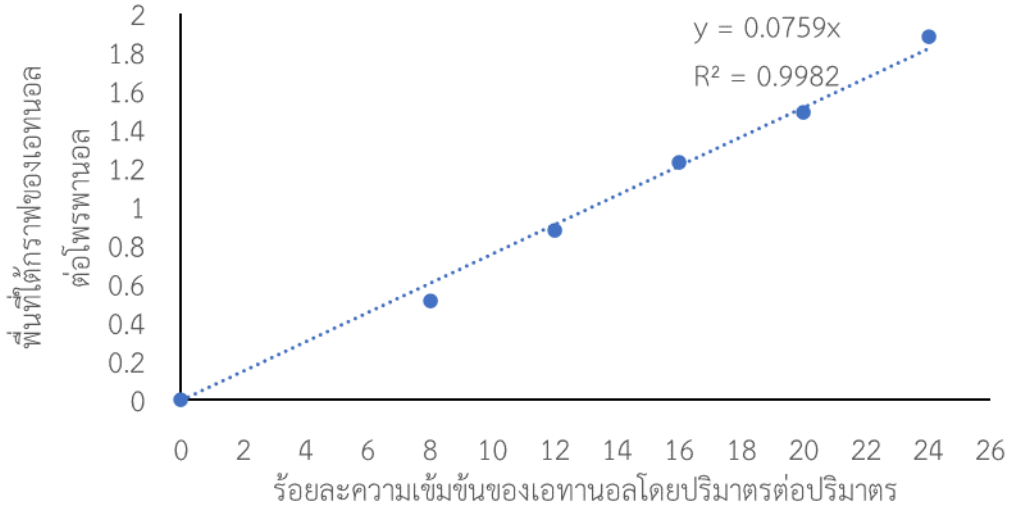
5. ใช้คอลัมน์ DB-1 (Agilent J&W GC Column) ความยาว 30 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.32 มิลลิเมตร ความหนาของฟิล์ม 5 ไมครอน อุณหภูมิคอลัมน์ 60 องศาเซลเซียส ใช้ตัวตรวจวัด (Detector) ชนิด FID โดยปรับอุณหภูมิเท่ากับ 180 องศาเซลเซียส Sampling rate เท่ากับ 40 มิลลิลิตรต่อวินาที อุณหภูมิของตำแหน่งฉีดสาร (Injector) เท่ากับ 150 องศาเซลเซียส ใช้ก๊าซฮีเลียมเป็นก๊าซตัวพา เลือกโหมด Linear Velocity

6. นำพื้นที่ใต้กราฟ (Peak Area) ของสารมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นมาสร้างกราฟมาตรฐาน โดยคำนวณอัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟของเอทานอลต่อโพรพานอลในแต่ละความเข้มข้นซึ่งกำหนดให้เป็นแกน y และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเอทานอลเป็นแกน x

วิธีการวิเคราะห์เอทานอลในตัวอย่าง

1. วิเคราะห์ปริมาณเอทานอลในตัวอย่างโดยผสม สารละลายโพรพานอลร้อยละ 10โดยปริมาตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และตัวอย่าง 500 ไมโครลิตร

2. วิเคราะห์ดังสภาวะข้างต้น จากนั้นนำเอาอัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟของเอทานอลในสารตัวอย่างต่อโพรพานอลมาเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นของเอทานอล



รูปที่ ข-1 กราฟมาตรฐานเอทานอล

3. การเตรียมสารละลาย McFarland standard

สารละลาย McFarland standard หมายเลข 1-10 ใช้ในการเปรียบเทียบความขุ่นของสารละลายเชื้อแบคทีเรียและเชื้อยีสต์ เพื่อใช้ประมาณความหนาแน่นของจำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร สามารถเตรียมสารละลาย McFarland standard หมายเลข 1-10 ได้ดังนี้

1. เตรียมหลอดทดลองพร้อมฝาปิดสนิทจานวน 10 หลอด ที่มีลักษณะเหมือนกันทุกประการ เขียนเลขกำกับหมายเลข 1-10 ไว้ที่หลอด
2. เตรียมสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และเตรียมสารละลายแบเรียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร
3. ปิเปตสารละลายทั้งสองชนิดลงในหลอดทดลองแต่ละหมายเลขในสัดส่วนที่แตกต่างกัน ดังตารางที่ ข-1

ตารางที่ ข-1 แสดงการเตรียมสารละลาย Mcfarland Standard

หมายเลขของ Mcfarland Standard	1% Sulfuric acid aqueous solution (ml)	1% Barium chloroide aqueous solution (ml)
1	9.9	0.1
2	9.8	0.2
3	9.7	0.3
4	9.6	0.4
5	9.5	0.5
6	9.4	0.6
7	9.3	0.7
8	9.2	0.8
9	9.1	0.9
10	9.0	1.0

4. วัดความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี Phenol-sulfuric (Dubois, 1956)

4.1 กราฟมาตรฐานสารละลายน้ำตาลกลูโคส

ใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 10 20 30 40 50 60 70 80 90 และ 100 µg/ml

1. ใส่สารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายฟีนอลความเข้มข้น 5% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

2. เขย่าสารละลายให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 15 นาทีที่อุณหภูมิห้อง

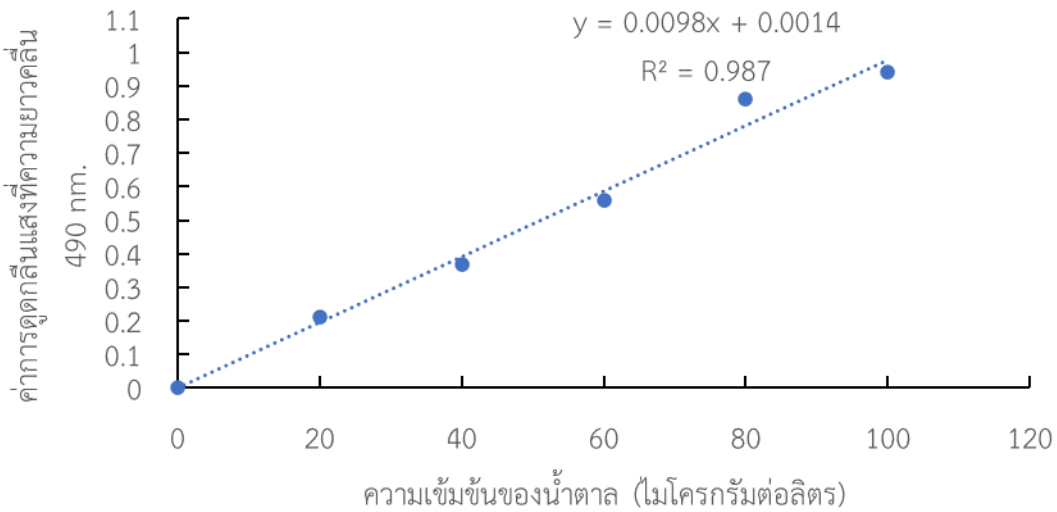
3. วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

4.2 วิธีการวิเคราะห์

1. ใส่ตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ ในการทดลองนี้คือน้ำหมัก ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายฟีนอลความเข้มข้น 5% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

2. เขย่าสารละลายให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 15 นาทีที่อุณหภูมิห้อง

3. วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร



รูปที่ ข-2 กราฟมาตรฐานสารละลายน้ำตาลกลูโคส

ภาคผนวก ค

แบบประเมินทางประสาทสัมผัส

แบบประเมินการทดสอบทางประสาทสัมผัสผลิตภัณฑ์คอมบูชาจากชาอู่หลง ในแต่ละอัตราส่วนผสมของยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกเปรียบเทียบคอมบูชาทางการค้า

<u>คำแนะนำ</u> : กรุณาทดสอบตัวอย่างตามลำดับที่นำเสนอ แล้วให้คะแนนทบุรีความชอบในแต่ละคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ โดยกำหนดให้

1 = ไม่ชอบมากที่สุด	**2 = ไม่ชอบมาก**	**3 = ไม่ชอบปานกลาง**
4 = ไม่ชอบเล็กน้อย	**5 = เฉยๆ**	**6 = ชอบเล็กน้อย**
7 = ชอบปานกลาง	**8 = ชอบมาก**	**9 = ชอบมากที่สุด**

ชุดที่ 1 : คอมบูชาที่ผ่านการหมัก 7 วัน

ตัวอย่างชาหมัก	ความใส	สี	กลิ่น	รสชาติ	ความชอบโดยรวม
101					
102					
103					
104					
105					
106					

<u>ข้อเสนอแนะ</u>

ภาคผนวก ง
การวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางที่ ง-1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณของยีสต์ระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชาด้วยหัวเชื้อคอมบูชาจากแหล่งต่างๆ หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
นนทบุรี	Between Groups	18.365	5	3.673	36729.300	.000
	Within Groups	.001	12	.000		
	Total	18.366	17			
กรุงเทพมหานคร	Between Groups	16.635	5	3.327	33269.300	.000
	Within Groups	.001	12	.000		
	Total	16.636	17			
เชียงใหม่	Between Groups	16.634	5	3.327	33267.600	.000
	Within Groups	.001	12	.000		
	Total	16.635	17			

Post Hoc Tests (Dancan)

นนทบุรี

		Subset for alpha = 0.05					
day	N	1	2	3	4	5	6
day0	3	5.0900					
day2	3		6.1700				
day10	3			7.3900			
day4	3				7.6400		
day8	3					7.7100	
day6	3						7.8500
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

กรุงเทพมหานคร

		Subset for alpha = 0.05					
day	N	1	2	3	4	5	6
day0	3	5.0500					
day2	3		6.3700				
day10	3			7.2600			
day8	3				7.4100		
day4	3					7.6700	
day6	3						7.8300
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เชียงใหม่

		Subset for alpha = 0.05					
day	N	1	2	3	4	5	6
day0	3	5.0800					
day2	3		6.3700				
day10	3			7.2000			
day8	3				7.3800		
day4	3					7.7700	
day6	3						7.8400
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ง-2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียอะซิติกระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชา โดยใช้หัวเชื้อคอมบูชาจากแหล่งต่างๆ หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
นนทบุรีGYC	Between Groups	15.322	5	3.064	30644.900	.000
	Within Groups	.001	12	.000		
	Total	15.324	17			
นนทบุรีGEM	Between Groups	13.894	5	2.779	27788.900	.000
	Within Groups	.001	12	.000		
	Total	13.896	17			
กทมGYC	Between Groups	12.597	5	2.519	25194.500	.000
	Within Groups	.001	12	.000		
	Total	12.598	17			
กทมGEM	Between Groups	13.593	5	2.719	27186.900	.000
	Within Groups	.001	12	.000		

	Total	13.595	17			
เชียงใหม่GYC	Between Groups	15.651	5	3.130	31301.600	.000
	Within Groups	.001	12	.000		
	Total	15.652	17			
เชียงใหม่ GEM	Between Groups	16.490	5	3.298	716.967	.000
	Within Groups	.055	12	.005		
	Total	16.545	17			

Post Hoc Test (Duncan)

หัวเชื้อนนทบุรีอาหารGYC

		Subset for alpha = 0.05					
day	N	1	2	3	4	5	6
day0	3	5.1400					
day2	3		6.2600				
day10	3			7.2900			
day4	3				7.4500		
day8	3					7.6000	
day6	3						7.7100
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

หัวเชื้อนนทบุรีอาหารGEM

		Subset for alpha = 0.05					
day	N	1	2	3	4	5	6
day0	3	5.2000					
day2	3		6.2700				
day10	3			7.0300			
day4	3				7.4000		
day8	3					7.5800	
day6	3						7.6900
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

หัวเชื้อกรุงเทพมหานครอาหารGYC

		Subset for alpha = 0.05					
day	N	1	2	3	4	5	6
day0	3	5.0400					
day2	3		6.3000				
day4	3			7.0100			
day10	3				7.1000		
day8	3					7.3100	
day6	3						7.5100
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

หัวเชื้อกรุงเทพมหานครอาหาร GEM

		Subset for alpha = 0.05					
day	N	1	2	3	4	5	6
day0	3	5.0100					
day2	3		6.3100				
day4	3			7.0800			
day10	3				7.1300		
day8	3					7.3700	
day6	3						7.5700
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

หัวเชื้อเชียงใหม่ อาหารGYC

		Subset for alpha = 0.05					
day	N	1	2	3	4	5	6
day0	3	5.0500					
day2	3		6.3400				
day10	3			7.3000			
day4	3				7.4700		
day8	3					7.5100	
day6	3						7.6900
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

หัวเชื้อเชียงใหม่ อาหารGEM

		Subset for alpha = 0.05			
day	N	1	2	3	4
day0	3	5.0600			
day2	3		6.3400		
day10	3			7.4600	
day4	3			7.5400	
day8	3			7.5800	7.5800
day6	3				7.6900
Sig.		1.000	1.000	.061	.070

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ง-3 การเปลี่ยนแปลงของพีเอชระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชาด้วยหัวเชื้อคอมบูชาจากแหล่งต่างๆ หมักที่อุณหภูมิห้องนาน 10 วัน

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Day0	Between Groups	.003	2	.002	29.400	.001
	Within Groups	.000	6	.000		
	Total	.004	8			
Day2	Between Groups	.025	2	.012	124.000	.000
	Within Groups	.001	6	.000		
	Total	.025	8			
Day4	Between Groups	.022	2	.011	108.000	.000
	Within Groups	.001	6	.000		
	Total	.022	8			
Day6	Between Groups	.006	2	.003	28.000	.001
	Within Groups	.001	6	.000		
	Total	.006	8			
Day8	Between Groups	.004	2	.002	21.000	.002
	Within Groups	.001	6	.000		
	Total	.005	8			
Day10	Between Groups	.013	2	.007	100.500	.000
	Within Groups	.000	6	.000		
	Total	.014	8			

Post Hoc Test (Duncan)

Day0

sample	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
เชียงใหม่	3	4.3600	
นนทบุรี	3	4.3667	
กรุงเทพฯ	3		4.4033
Sig.		.315	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Day2

sample	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
เชียงใหม่	3	4.1900		
นนทบุรี	3		4.2100	
กรุงเทพฯ	3			4.3100
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Day4

sample	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
เชียงใหม่	3	3.6600		
นนทบุรี	3		3.7200	
กรุงเทพฯ	3			3.7800
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Day6

sample	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
เชียงใหม่	3	3.4100		
กรุงเทพฯ	3		3.4300	
นนทบุรี	3			3.4700
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Day8

sample	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
นนทบุรี	3	3.3100	
เชียงใหม่	3	3.3200	
กรุงเทพฯ	3		3.3600
Sig.		.267	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Day10

sample	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
เชียงใหม่	3	2.8500		
นนทบุรี	3		2.9200	
กรุงเทพฯ	3			2.9400
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ง-4 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดทั้งหมด (ร้อยละกรดอะซิติก) ระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชาด้วยหัวเชื้อคอมบูชาจากแหล่งต่างๆ หมักที่อุณหภูมิห้องนาน 10 วัน

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Day0	Between Groups	.000	2	.000	1.000	.422
	Within Groups	.001	6	.000		
	Total	.001	8			
Day2	Between Groups	.000	2	.000	1.000	.422
	Within Groups	.001	6	.000		
	Total	.001	8			
Day4	Between Groups	.000	2	.000	.	.
	Within Groups	.000	6	.000		
	Total	.000	8			
Day6	Between Groups	.001	2	.001	7.000	.027
	Within Groups	.001	6	.000		
	Total	.002	8			
Day8	Between Groups	.004	2	.002	21.000	.002
	Within Groups	.001	6	.000		
	Total	.005	8			
Day10	Between Groups	.001	2	.001	10.500	.011

	Within Groups	.000	6	.000		
	Total	.002	8			

Post Hoc Test (Duncan)

Day0

sample	N	Subset for alpha = 0.05 1
1	3	.0500
3	3	.0500
2	3	.0600
Sig.		.281

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Day2

sample	N	Subset for alpha = 0.05 1
นนทบุรี	3	.0700
กรุงเทพฯ	3	.0800
เชียงใหม่	3	.0800
Sig.		.281

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Day6

		Subset for alpha = 0.05	
sample	N	1	2
นนทบุรี	3	.1300	
เชียงใหม่	3		.1500
กรุงเทพฯ	3		.1600
Sig.		1.000	.267

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Day8

sample	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
นนทบุรี	3	.2100	
กรุงเทพฯ	3		.2500
เชียงใหม่	3		.2600
Sig.		1.000	.267

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Day10

sample	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
นนทบุรี	3	.4200	
เชียงใหม่	3	.4300	
กรุงเทพฯ	3		.4500
Sig.		.184	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ง-5 ปริมาณแอลกอฮอล์และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรของไอโซเลตยีสต์ หมักในชาอู่หลงที่มีพีเอช 3.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน

ANOVA

ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.583	9	.176	307.005	.000
Within Groups	.011	20	.001		
Total	1.594	29			

Post Hoc Test (Duncan)

ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

yeast	N	Subset for alpha = 0.05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
yc8	3	.4827							
yc9	3		.5583						
yn2	3			.6753					
yn1002	3			.6797					
yn4	3			.6907					
yc6	3				.7607				
yn404	3					.8480			
YN204	3						.9677		

YN3	3							1.0533	
yn403	3								1.2800
Sig.		1.000	1.000	.468	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ปริมาณเอทานอล

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3.501	9	.389	2.618	.035
Within Groups	2.972	20	.149		
Total	6.473	29			

ethanol

		Subset for alpha = 0.05	
YJ	N	1	2
yc8	3	3.8077	
yc9	3	3.8380	
yn1002	3	4.2477	4.2477
yn2	3	4.2477	4.2477
yn4	3	4.2840	4.2840
yc6	3	4.3417	4.3417
yn404	3	4.3587	4.3587
YN204	3		4.6290
YN3	3		4.7930
yn403	3		4.9080
Sig.		.139	.081

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ง-6 ปริมาณกรดทั้งหมด(ร้อยละกรดอะซิติก) ที่ผลิตได้จากไอโซเลตแบคทีเรียอะซิติกในชาอู่หลง หมักในสภาวะนิ่ง อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสนาน 10 วัน

ANOVA

ปริมาณกรดทั้งหมด

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.615	9	.179	74.485	.000
Within Groups	.048	20	.002		
Total	1.663	29			

Post Hoc Test (Duncan)

ปริมาณกรดทั้งหมด

A	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
AN609	3	.6298						
AN402	3	.6298						
AJ803	3	.6874	.6874					
AC1001	3	.6889	.6889					
Ac211	3		.7326	.7326				
AC403	3			.7872	.7872			
AC210	3				.8678			
AC202	3					1.0675		
AJ809	3						1.1750	
AJ605	3							1.3176
Sig.		.191	.299	.188	.058	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ง-7 ค่าพีเอชของคอมบูชาจากชาอู่หลงหมักด้วยเชื้อผสมระหว่างยีสต์และแบคทีเรียอะซิติก อัตราส่วนที่แตกต่างกัน ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 21 วัน

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
3:7	Between Groups	25.510	4	6.377	63774.400	.000
	Within Groups	.001	10	.000		
	Total	25.511	14			
4:6	Between Groups	26.080	4	6.520	40750.271	.000
	Within Groups	.002	10	.000		
	Total	26.082	14			
5:5	Between Groups	25.110	4	6.277	23540.375	.000
	Within Groups	.003	10	.000		
	Total	25.112	14			
6:4	Between Groups	26.804	4	6.701	111684.556	.000
	Within Groups	.001	10	.000		
	Total	26.805	14			
7:3	Between Groups	26.818	4	6.705	62855.219	.000
	Within Groups	.001	10	.000		
	Total	26.819	14			
หัวเชื้อทางการค้า	Between Groups	22.667	4	5.667	14407.186	.000
	Within Groups	.004	10	.000		
	Total	22.671	14			

Post Hoc Test (Duncan)

3:7

		Subset for alpha = 0.05				
day	N	1	2	3	4	5
day21	3	2.6800				
day14	3		2.7167			
day10	3			2.7767		
Day7	3				2.8367	
Day0	3					6.0100
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

4:6

		Subset for alpha = 0.05				
day	N	1	2	3	4	5
day21	3	2.6633				
day14	3		2.7800			
day10	3			2.8600		
Day7	3				2.9267	
Day0	3					6.0967
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

5:5

		Subset for alpha = 0.05				
day	N	1	2	3	4	5
day21	3	2.6867				
day14	3		2.8733			
day10	3			3.0067		
Day7	3				3.1433	
Day0	3					6.1400
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

6:4

		Subset for alpha = 0.05				
day	N	1	2	3	4	5
day21	3	2.6900				
day14	3		2.8633			
day10	3			2.9033		
Day7	3				3.0000	
Day0	3					6.1967
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

7:3

		Subset for alpha = 0.05				
day	N	1	2	3	4	5
day21	3	2.6433				
day14	3		2.8667			
day10	3			2.9033		
Day7	3				3.0000	
Day0	3					6.1833
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

หัวเชื้อทางการค้า

		Subset for alpha = 0.05				
day	N	1	2	3	4	5
day21	3	2.6367				
day14	3		3.0367			
day10	3			3.2167		
Day7	3				3.4633	
Day0	3					6.0867
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

ตารางที่ ง-8 ปริมาณกรดทั้งหมด (ร้อยละกรดอะซิติก) ของคอมบูชาจากชาอู่หลง หมักด้วยยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกในอัตราส่วนต่างๆ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 21 วัน

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
3:7	Between Groups	1.772	4	.443	1544.919	.000
	Within Groups	.003	10	.000		
	Total	1.774	14			
4:6	Between Groups	2.440	4	.610	1663.955	.000
	Within Groups	.004	10	.000		
	Total	2.444	14			
5:5	Between Groups	1.775	4	.444	272.752	.000
	Within Groups	.016	10	.002		
	Total	1.791	14			
6:4	Between Groups	1.541	4	.385	393.156	.000
	Within Groups	.010	10	.001		
	Total	1.551	14			
7:3	Between Groups	1.689	4	.422	1292.500	.000
	Within Groups	.003	10	.000		
	Total	1.692	14			
หัวเชื้อทางการค้า	Between Groups	1.863	4	.466	785.039	.000
	Within Groups	.006	10	.001		
	Total	1.869	14			

Post Hoc Test (Duncan)

3:7

		Subset for alpha = 0.05				
day	N	1	2	3	4	5
Day0	3	.1767				
Day7	3		.4600			
day10	3			.5433		
day14	3				.7567	
day21	3					1.2067
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

4:6

		Subset for alpha = 0.05				
day	N	1	2	3	4	5
Day0	3	.1567				
Day7	3		.4100			
day10	3			.4867		
day14	3				.6267	
day21	3					1.3533
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

5:5

		Subset for alpha = 0.05			
day	N	1	2	3	4
Day0	3	.1400			
Day7	3		.3633		
day10	3		.4167		
day14	3			.7467	
day21	3				1.1267
Sig.		1.000	.136	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

6:4

		Subset for alpha = 0.05				
day	N	1	2	3	4	5
Day0	3	.1633				
Day7	3		.4300			
day10	3			.4900		
day14	3				.6833	
day21	3					1.1267
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

7:3

day	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
Day0	3	.1533				
Day7	3		.3967			
day10	3			.4933		
day14	3				.7300	
day21	3					1.1433
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

หัวเชื้อทางการค้า

day	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Day0	3	.1800			
Day7	3	.2000			
day10	3		.2767		
day14	3			.5367	
day21	3				1.1200
Sig.		.338	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ง-9 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของคอมบูชาด้วยเชื้อบริสุทธิ์ของยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน หมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 21 วัน

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
3:7	Between Groups	6244.502	4	1561.126	488.112	.000
	Within Groups	31.983	10	3.198		
	Total	6276.485	14			
4:6	Between Groups	6082.675	4	1520.669	188.039	.000
	Within Groups	80.870	10	8.087		
	Total	6163.545	14			
5:5	Between Groups	5809.190	4	1452.297	160.234	.000
	Within Groups	90.636	10	9.064		
	Total	5899.825	14			
6:4	Between Groups	6313.710	4	1578.428	151.835	.000
	Within Groups	103.957	10	10.396		
	Total	6417.667	14			

7:3	Between Groups	6083.760	4	1520.940	139.177	.000
	Within Groups	109.281	10	10.928		
	Total	6193.040	14			
หัวเชื้อทางการค้า	Between Groups	6335.653	4	1583.913	554.909	.000
	Within Groups	28.544	10	2.854		
	Total	6364.196	14			

Post Hoc Test (Duncan)

3:7

		Subset for alpha = 0.05				
day	N	1	2	3	4	5
day21	3	47.3800				
day14	3		68.8100			
day10	3			86.9400		
Day7	3				95.2033	
Day0	3					104.7967
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

4:6

		Subset for alpha = 0.05				
day	N	1	2	3	4	5
day21	3	48.5000				
day14	3		67.9592			
day10	3			87.2789		
Day7	3				95.2551	
Day0	3					104.6429
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

5:5

		Subset for alpha = 0.05				
day	N	1	2	3	4	5
day21	3	49.0476				
day14	3		68.4694			
day10	3			87.8571		
Day7	3				95.7653	
Day0	3					103.2143
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

6:4

		Subset for alpha = 0.05				
day	N	1	2	3	4	5
day21	3	48.1973				
day14	3		66.1905			
day10	3			88.2313		
Day7	3				95.6122	
Day0	3					104.3367
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

7:3

		Subset for alpha = 0.05				
day	N	1	2	3	4	5
day21	3	48.9116				
day14	3		66.2925			
day10	3			87.3469		
Day7	3				95.1020	
Day0	3					104.3367
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

หัวเชื้อทางการค้า

day	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
day21	3	47.1088				
day14	3		68.5034			
day10	3			88.2653		
Day7	3				94.2857	
Day0	3					105.0510
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ง-10 ปริมาณของแข็งที่ละลายทั้งหมดของคอมบูชาหมักด้วยเชื้อบริสุทธิ์ของยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน หมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 21 วัน

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
3:7	Between Groups	40.411	4	10.103	24.843	.000
	Within Groups	4.067	10	.407		
	Total	44.477	14			
4:6	Between Groups	49.776	4	12.444	60.408	.000
	Within Groups	2.060	10	.206		
	Total	51.836	14			
5:5	Between Groups	35.664	4	8.916	43.282	.000
	Within Groups	2.060	10	.206		
	Total	37.724	14			
6:4	Between Groups	42.816	4	10.704	17.781	.000
	Within Groups	6.020	10	.602		
	Total	48.836	14			
7:3	Between Groups	36.291	4	9.073	43.900	.000
	Within Groups	2.067	10	.207		
	Total	38.357	14			
หัวเชื้อทางการค้า	Between Groups	9.651	4	2.413	11.562	.001
	Within Groups	2.087	10	.209		
	Total	11.737	14			

Post Hoc Test (Duncan)

3:7

		Subset for alpha = 0.05			
day	N	1	2	3	4
day21	3	7.0000			
day14	3		8.5333		
Day7	3		9.6000	9.6000	
day10	3			9.8000	
Day0	3				12.0000
Sig.		1.000	.068	.709	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

4:6

		Subset for alpha = 0.05				
day	N	1	2	3	4	5
day21	3	6.8000				
day14	3		7.8000			
day10	3			9.0000		
Day7	3				10.2000	
Day0	3					12.0000
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

5:5

		Subset for alpha = 0.05		
day	N	1	2	3
day21	3	7.2000		
day14	3		9.0000	
day10	3		9.6000	
Day7	3		9.8000	
Day0	3			12.0000
Sig.		1.000	.066	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

6:4

day	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
day21	3	7.0000			
day14	3	8.0000	8.0000		
day10	3		9.2000	9.2000	
Day7	3			9.6000	
Day0	3				12.0000
Sig.		.146	.087	.542	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

7:3

day	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
day21	3	7.4000			
day14	3		8.4667		
Day7	3			9.6000	
day10	3			10.1000	
Day0	3				12.0000
Sig.		1.000	1.000	.208	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

หัวเชื้อทางการค้า

day	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
day21	3	9.8000	
day14	3	9.9333	
day10	3	10.1000	
Day7	3	10.4000	
Day0	3		12.0000
Sig.		.164	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารงที่ ง-11 ปริมาณแอลกอฮอล์ระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชาด้วยเชื้อบริสุทธิ์ของยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน หมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 21 วัน

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
3:7	Between Groups	16.864	4	4.216	48.708	.000
	Within Groups	.866	10	.087		
	Total	17.730	14			
4:6	Between Groups	20.167	4	5.042	50.567	.000
	Within Groups	.997	10	.100		
	Total	21.164	14			
5:5	Between Groups	11.788	4	2.947	89.736	.000
	Within Groups	.328	10	.033		
	Total	12.116	14			
6:4	Between Groups	14.314	4	3.579	45.005	.000
	Within Groups	.795	10	.080		
	Total	15.109	14			
7:3	Between Groups	12.143	4	3.036	36.595	.000
	Within Groups	.830	10	.083		
	Total	12.972	14			
หัวเชื้อทางการค้า	Between Groups	11.143	4	2.786	58.360	.000
	Within Groups	.477	10	.048		
	Total	11.620	14			

Post Hoc Test (Duncan)

3:7

		Subset for alpha = 0.05		
day	N	1	2	3
Day0	3	.4467		
Day7	3		2.0500	
day21	3		2.5933	
day10	3		2.6000	
day14	3			3.6967
Sig.		1.000	.053	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

4:6

		Subset for alpha = 0.05		
day	N	1	2	3
Day0	3	.4767		
day21	3		2.2467	
Day7	3		2.5633	
day10	3		2.7100	
day14	3			4.0967
Sig.		1.000	.117	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

5:5

		Subset for alpha = 0.05			
day	N	1	2	3	4
Day0	3	.4933			
Day7	3		1.9000		
day21	3			2.5767	
day10	3			2.6100	
day14	3				3.0067
Sig.		1.000	1.000	.826	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

6:4

		Subset for alpha = 0.05		
day	N	1	2	3
Day0	3	.4700		
Day7	3		2.4233	
day10	3		2.5367	
day21	3		2.8000	
day14	3			3.3500
Sig.		1.000	.149	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

7:3

day	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Day0	3	.4800	
day21	3		2.5100
Day7	3		2.5733
day10	3		2.6500
day14	3		3.0133
Sig.		1.000	.074

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

หัวเชื้อคอมทางการค้า

day	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Day0	3	.0000	
Day7	3		1.9267
day10	3		1.9933
day21	3		2.2500
day14	3		2.3200
Sig.		1.000	.067

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ง-12 ฤทธิ์ในการยับยั้งปฏิกริยาออกซิเดชัน ด้วยวิธี DPPH ของคอมบูชาด้วยเชื้อยีสต์และแบคทีเรียอะซิติกในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน หมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 21 วัน

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
DPPH3.7	Between Groups	228.875	4	57.219	75.552	.000
	Within Groups	7.573	10	.757		
	Total	236.448	14			
DPPH4.6	Between Groups	230.256	4	57.564	74.808	.000
	Within Groups	7.695	10	.769		
	Total	237.951	14			
DPPH5.5	Between Groups	241.751	4	60.438	47.710	.000
	Within Groups	12.668	10	1.267		
	Total	254.418	14			
DPPH6.4	Between Groups	183.872	4	45.968	20.527	.000
	Within Groups	22.394	10	2.239		
	Total	206.266	14			

DPPH7.3	Between Groups	245.154	4	61.289	210.305	.000
	Within Groups	2.914	10	.291		
	Total	248.069	14			
DPPHนนทบุรี	Between Groups	263.176	4	65.794	141.515	.000
	Within Groups	4.649	10	.465		
	Total	267.825	14			

Post Hoc Test (Duncan)

3:7

		Subset for alpha = 0.05			
day	N	1	2	3	4
Day0	3	86.4367			
Day7	3		90.2767		
day10	3			94.2733	
day14	3			95.7333	95.7333
day21	3				97.1200
Sig.		1.000	1.000	.067	.080

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

4:6

		Subset for alpha = 0.05			
day	N	1	2	3	4
Day0	3	87.7300			
Day7	3		91.6000		
day10	3			95.7067	
day14	3			96.9100	
day21	3				98.5100
Sig.		1.000	1.000	.124	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

5:5

		Subset for alpha = 0.05		
day	N	1	2	3
Day0	3	85.7700		
Day7	3		90.4867	
day10	3			94.5300
day14	3			95.8700
day21	3			96.4800
Sig.		1.000	1.000	.070

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

6:4

		Subset for alpha = 0.05	
day	N	1	2
Day0	3	87.8267	
Day7	3	90.5133	
day10	3		94.6500
day14	3		95.6800
day21	3		97.3167
Sig.		.053	.063

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

7:3

		Subset for alpha = 0.05				
day	N	1	2	3	4	5
Day0	3	86.4267				
Day7	3		90.5600			
day10	3			94.8667		
day14	3				95.8533	
day21	3					97.5767
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

หัวเชื้อทางการค้า

		Subset for alpha = 0.05			
day	N	1	2	3	4
Day0	3	85.4267			
Day7	3		90.0200		
day10	3			94.9467	
day14	3			95.5167	95.5167
day21	3				96.5567
Sig.		1.000	1.000	.330	.091

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ ง- 13 การทดสอบทางประสาทสัมผัสของคอมบูชาที่อัตราส่วน 3:7

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ความใส	Between Groups	10.167	3	3.389	2.297	.081
	Within Groups	171.133	116	1.475		
	Total	181.300	119			
สี	Between Groups	7.667	3	2.556	2.324	.079
	Within Groups	127.533	116	1.099		
	Total	135.200	119			
กลิ่น	Between Groups	14.892	3	4.964	2.003	.117
	Within Groups	287.433	116	2.478		
	Total	302.325	119			
รสชาติ	Between Groups	179.000	3	59.667	20.661	.000
	Within Groups	335.000	116	2.888		
	Total	514.000	119			
ความชอบโดยรวม	Between Groups	104.158	3	34.719	12.999	.000
	Within Groups	309.833	116	2.671		
	Total	413.992	119			

Post Hoc Test (Duncan)

ความใส

		Subset for alpha = 0.05	
day	N	1	2
day21	30	6.5000	
day14	30	6.7333	6.7333
day10	30	6.8667	6.8667
day7	30		7.3000
Sig.		.275	.090

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

สี

		Subset for alpha = 0.05	
day	N	1	2
day21	30	6.2667	
day14	30	6.8000	6.8000
day7	30		6.8333
day10	30		6.9000
Sig.		.051	.731

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

กลิ่น

day	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
day21	30	5.3000	
day14	30	5.4667	5.4667
day10	30	5.7000	5.7000
day7	30		6.2333
Sig.		.358	.077

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

รสชาติ

day	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
day21	30	3.7667	
day14	30	3.8000	
day7	30		6.0667
day10	30		6.3667
Sig.		.940	.496

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

ความชอบโดยรวม

day	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
day21	30	4.4333	
day14	30	4.7000	
day7	30		6.3333
day10	30		6.5000
Sig.		.529	.694

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

ตางรางที่ ง- 14 การทดสอบทางประสาทสัมผัสของคอมบูชาที่อัตราส่วน 4:6

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ความใส	Between Groups	10.167	3	3.389	2.297	.081
	Within Groups	171.133	116	1.475		
	Total	181.300	119			
สี	Between Groups	7.667	3	2.556	2.324	.079
	Within Groups	127.533	116	1.099		
	Total	135.200	119			
กลิ่น	Between Groups	14.892	3	4.964	2.003	.117
	Within Groups	287.433	116	2.478		
	Total	302.325	119			
รสชาติ	Between Groups	179.000	3	59.667	20.661	.000
	Within Groups	335.000	116	2.888		
	Total	514.000	119			
ความชอบโดยรวม	Between Groups	104.158	3	34.719	12.999	.000
	Within Groups	309.833	116	2.671		
	Total	413.992	119			

Post Hoc Test (Duncan)

ความใส

		Subset for alpha = 0.05	
day	N	1	2
day213.7	30	6.5000	
day143.7	30	6.7333	6.7333
day103.7	30	6.8667	6.8667
day73.7	30		7.3000
Sig.		.275	.090

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

สี

		Subset for alpha = 0.05	
day	N	1	2
day21	30	6.2667	
day14	30	6.8000	6.8000
day7	30		6.8333
day10	30		6.9000
Sig.		.051	.731

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

กลิ่น

		Subset for alpha = 0.05	
day	N	1	2
day21	30	5.3000	
day14	30	5.4667	5.4667
day10	30	5.7000	5.7000
day7	30		6.2333
Sig.		.358	.077

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

รสชาติ

		Subset for alpha = 0.05	
day	N	1	2
day21	30	3.7667	
day14	30	3.8000	
day7	30		6.0667
day10	30		6.3667
Sig.		.940	.496

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

ความชอบโดยรวม

		Subset for alpha = 0.05	
day	N	1	2
day21	30	4.4333	
day14	30	4.7000	
day7	30		6.3333
day10	30		6.5000
Sig.		.529	.694

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

ตารางที่ ง- 15 การทดสอบทางประสาทสัมผัสของคอมบูชาที่อัตราส่วน 5:5

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ความใส	Between Groups	11.400	3	3.800	2.163	.096
	Within Groups	203.800	116	1.757		
	Total	215.200	119			
สี	Between Groups	9.500	3	3.167	2.045	.111
	Within Groups	179.667	116	1.549		
	Total	189.167	119			
กลิ่น	Between Groups	7.892	3	2.631	1.077	.362
	Within Groups	283.433	116	2.443		
	Total	291.325	119			
รสชาติ	Between Groups	82.158	3	27.386	10.428	.000
	Within Groups	304.633	116	2.626		
	Total	386.792	119			
ความชอบโดยรวม	Between Groups	44.492	3	14.831	5.865	.001
	Within Groups	293.300	116	2.528		
	Total	337.792	119			

Post Hoc Test (Duncan)

ความใส

		Subset for alpha = 0.05	
day	N	1	2
day21	30	6.3000	
day10	30	6.8333	6.8333
day14	30	6.9333	6.9333
day7	30		7.1333
Sig.		.082	.414

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

สี

		Subset for alpha = 0.05	
day	N	1	2
day21	30	6.1333	
day14	30	6.6000	6.6000
day7	30	6.7000	6.7000
day10	30		6.9000
Sig.		.098	.384

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

กลิ่น

day	N	Subset for alpha = 0.05
		1
day21	30	5.3000
day14	30	5.3667
day10	30	5.7000
day7	30	5.9333
Sig.		.157

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

รสชาติ

day	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
day21	30	4.3333	
day14	30	4.6333	
day10	30		5.9000
day7	30		6.3000
Sig.		.475	.341

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

ความชอบโดยรวม

day	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
day21	30	4.8333	
day14	30	5.0667	
day10	30		5.9667
day7	30		6.3000
Sig.		.571	.419

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

ตารางที่ ง- 16 การทดสอบทางประสาทสัมผัสของคอมบูชาที่อัตราส่วน 6:4

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ความใส	Between Groups	14.467	3	4.822	2.610	.055
	Within Groups	214.333	116	1.848		
	Total	228.800	119			
สี	Between Groups	14.200	3	4.733	3.244	.025
	Within Groups	169.267	116	1.459		
	Total	183.467	119			
กลิ่น	Between Groups	14.492	3	4.831	1.837	.144
	Within Groups	305.100	116	2.630		
	Total	319.592	119			
รสชาติ	Between Groups	75.000	3	25.000	6.624	.000
	Within Groups	437.800	116	3.774		
	Total	512.800	119			
ความชอบโดยรวม	Between Groups	63.767	3	21.256	6.850	.000
	Within Groups	359.933	116	3.103		
	Total	423.700	119			

Post Hoc Test (Duncan)

ความใส

		Subset for alpha = 0.05	
day	N	1	2
day21	30	6.1000	
day14	30	6.5333	6.5333
day10	30	6.7000	6.7000
day7	30		7.0667
Sig.		.109	.155

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

สี

		Subset for alpha = 0.05	
day	N	1	2
day21	30	6.1000	
day14	30	6.5000	6.5000
day7	30	6.6000	6.6000
day10	30		7.0667
Sig.		.133	.088

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

กลิ่น

day	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
day21	30	5.1667	
day14	30	5.6667	5.6667
day10	30	5.8000	5.8000
day7	30		6.1333
Sig.		.157	.298

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

รสชาติ

day	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
day21	30	4.6333	
day14	30	4.9333	
day10	30	5.3333	
day7	30		6.7000
Sig.		.192	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

ความชอบโดยรวม

day	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
day21	30	4.8000	
day14	30	5.0667	
day10	30	5.6333	
day7	30		6.7000
Sig.		.085	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

ตารางที่ ง- 17 การทดสอบทางประสาทสัมผัสของคอมบูชาที่อัตราส่วน 7:3

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ความใส	Between Groups	97.158	3	32.386	15.462	.000
	Within Groups	242.967	116	2.095		
	Total	340.125	119			
สี	Between Groups	67.092	3	22.364	12.640	.000
	Within Groups	205.233	116	1.769		
	Total	272.325	119			
กลิ่น	Between Groups	46.167	3	15.389	6.246	.001
	Within Groups	285.800	116	2.464		
	Total	331.967	119			
รสชาติ	Between Groups	71.667	3	23.889	5.642	.001
	Within Groups	491.133	116	4.234		
	Total	562.800	119			
ความชอบโดยรวม	Between Groups	72.900	3	24.300	7.912	.000
	Within Groups	356.267	116	3.071		
	Total	429.167	119			

Post Hoc Test (Duncan)

ความใส

		Subset for alpha = 0.05	
day	N	1	2
day21	30	4.8667	
day14	30		6.5333
day10	30		6.9333
day7	30		7.1667
Sig.		1.000	.112

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

สี

		Subset for alpha = 0.05	
day	N	1	2
day21	30	5.0333	
day14	30		6.6667
day7	30		6.8000
day10	30		6.8000
Sig.		1.000	.718

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

กลิ่น

day	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
day21	30	4.5667	
day14	30		5.5333
day10	30		5.6667
day7	30		6.3000
Sig.		1.000	.076

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

รสชาติ

day	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
day217.3	30	4.1333	
day147.3	30	4.5667	
day107.3	30		5.7000
day77.3	30		6.0000
Sig.		.416	.573

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

ความชอบโดยรวม

day	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
day217.3	30	4.3000		
day147.3	30	5.1000	5.1000	
day107.3	30		5.9667	5.9667
day77.3	30			6.3000
Sig.		.080	.058	.463

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

ตารางที่ ง- 18 การทดสอบทางประสาทสัมผัสของคอมบูชาที่ใช้หัวเชื้อทางการค้า

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ความใส	Between Groups	7.367	3	2.456	1.615	.190
	Within Groups	176.333	116	1.520		
	Total	183.700	119			
สี	Between Groups	9.758	3	3.253	1.907	.132
	Within Groups	197.833	116	1.705		
	Total	207.592	119			
กลิ่น	Between Groups	25.200	3	8.400	2.396	.072
	Within Groups	406.667	116	3.506		
	Total	431.867	119			
รสชาติ	Between Groups	16.358	3	5.453	2.295	.081
	Within Groups	275.567	116	2.376		
	Total	291.925	119			
ความชอบโดยรวม	Between Groups	26.433	3	8.811	3.820	.012
	Within Groups	267.533	116	2.306		
	Total	293.967	119			

Post Hoc Test (Duncan)

ความใส

day	N	Subset for alpha = 0.05 1
day21	30	6.5333
day14	30	7.0000
day10	30	7.1000
Day7	30	7.1667
Sig.		.071

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

สี

		Subset for alpha = 0.05	
day	N	1	2
day10	30	6.1667	
day21	30	6.5000	6.5000
day14	30	6.6000	6.6000
Day7	30		6.9667
Sig.		.230	.195

กลิ่น

		Subset for alpha = 0.05	
day	N	1	2
day21	30	4.6333	
day14	30	4.7667	4.7667
day10	30	5.3667	5.3667
Day7	30		5.7667
Sig.		.155	.052

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

รสชาติ

		Subset for alpha = 0.05	
day	N	1	2
day14	30	5.0667	
day21	30	5.2333	5.2333
day10	30	5.5667	5.5667
Day7	30		6.0333
Sig.		.240	.059

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

ความชอบโดยรวม

		Subset for alpha = 0.05	
day	N	1	2
day14	30	5.1333	
day10	30	5.6333	5.6333
day21	30		6.2000
Day7	30		6.3000
Sig.		.205	.111

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

ตารางที่ ง-19 การทดสอบทางประสาทสัมผัสของคอมบูชาเปรียบเทียบแต่ละอัตราส่วนในวันที่ 7 10 14 และ 21 ของการหมัก

วันที่ 7

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ความใส	Between Groups	1.117	5	.223	.140	.983
	Within Groups	277.833	174	1.597		
	Total	278.950	179			
สี	Between Groups	2.628	5	.526	.466	.801
	Within Groups	196.100	174	1.127		
	Total	198.728	179			
กลิ่น	Between Groups	5.828	5	1.166	.469	.799
	Within Groups	432.233	174	2.484		
	Total	438.061	179			
รสชาติ	Between Groups	18.911	5	3.782	1.481	.198
	Within Groups	444.400	174	2.554		
	Total	463.311	179			
ความชอบโดยรวม	Between Groups	8.844	5	1.769	1.034	.399
	Within Groups	297.733	174	1.711		
	Total	306.578	179			

Post Hoc Test (Duncan)

ความใส

Sample	N	Subset for alpha = 0.05
		1
6:4	30	7.0667
5:5	30	7.1333
7:3	30	7.1667
นนทบุรี	30	7.1667
4:6	30	7.2667
3:7	30	7.3000
Sig.		.542

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

สี

Sample	N	Subset for alpha = 0.05
		1
6:4	30	6.6000
4:6	30	6.6667
5:5	30	6.7000
6:4	30	6.8000
3:7	30	6.8333
นนทบุรี	30	6.9667
Sig.		.251

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

กลิ่น

Sample	N	Subset for alpha = 0.05
		1
นนทบุรี	30	5.7667
5:5	30	5.9333
4:6	30	6.0667
6:4	30	6.1333
3:7	30	6.2333
7:3	30	6.3000
Sig.		.261

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

รสชาติ

Sample	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
4:6	30	5.6333	
7:3	30	6.0000	6.0000
นนทบุรี	30	6.0333	6.0333
3:7	30	6.0667	6.0667
5:5	30	6.3000	6.3000
6:4	30		6.7000
Sig.		.155	.134

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

ความชอบโดยรวม

Sample	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
4:6	30	5.9333	
5:5	30	6.3000	6.3000
7:3	30	6.3000	6.3000
นนทบุรี	30	6.3000	6.3000
3:7	30	6.3333	6.3333
6:4	30		6.7000
Sig.		.300	.300

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

วันที่ 10

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ความใส	Between Groups	24.244	5	4.849	2.710	.022
	Within Groups	311.333	174	1.789		
	Total	335.578	179			
สี	Between Groups	16.378	5	3.276	2.165	.060
	Within Groups	263.200	174	1.513		
	Total	279.578	179			
กลิ่น	Between Groups	7.294	5	1.459	.577	.717
	Within Groups	439.567	174	2.526		
	Total	446.861	179			
รสชาติ	Between Groups	34.628	5	6.926	1.819	.111
	Within Groups	662.367	174	3.807		
	Total	696.994	179			
ความชอบโดยรวม	Between Groups	32.644	5	6.529	2.146	.062
	Within Groups	529.333	174	3.042		
	Total	561.978	179			

Post Hoc Test (Duncan)

ความใส

		Subset for alpha = 0.05	
sample	N	1	2
นนทบุรี	30	6.1000	
7:3	30	6.7000	6.7000
5:5	30		6.8333
6:4	30		6.9333
4:6	30		7.0000
3:7	30		7.3000
Sig.		.084	.125

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

สี

		Subset for alpha = 0.05	
sample	N	1	2
นนทบุรี	30	6.1667	
7:3	30		6.8000
3:7	30		6.9000
5:5	30		6.9000
4:6	30		7.0333
6:4	30		7.0667
Sig.		1.000	.465

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

กลิ่น

		Subset for alpha = 0.05
sample	N	1
4:6	30	5.2667
5:5	30	5.3667
นนทบุรี	30	5.3667
7:3	30	5.6667
3:7	30	5.7000
6:4	30	5.8000
Sig.		.265

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

รสชาติ

		Subset for alpha = 0.05	
sample	N	1	2
นนทบุรี	30	5.0667	
4:6	30	5.2667	5.2667
6:4	30	5.3333	5.3333
7:3	30	5.7000	5.7000
5:5	30	5.9000	5.9000
3:7	30		6.3667
Sig.		.145	.052

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

ความชอบโดยรวม

		Subset for alpha = 0.05	
sample	N	1	2
นนทบุรี	30	5.1333	
4:6	30	5.5333	5.5333
6:4	30	5.6333	5.6333
5:5	30	5.9667	5.9667
7:3	30	5.9667	5.9667
3:7	30		6.5000
Sig.		.101	.056

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

วันที่ 14

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ความใส	Between Groups	5.717	5	1.143	.568	.724
	Within Groups	350.033	174	2.012		
	Total	355.750	179			
สี	Between Groups	1.717	5	.343	.221	.953
	Within Groups	270.833	174	1.557		
	Total	272.550	179			
กลิ่น	Between Groups	14.844	5	2.969	1.128	.347
	Within Groups	457.800	174	2.631		
	Total	472.644	179			
รสชาติ	Between Groups	36.244	5	7.249	2.519	.031
	Within Groups	500.733	174	2.878		
	Total	536.978	179			
ความชอบโดยรวม	Between Groups	13.178	5	2.636	.844	.520
	Within Groups	543.400	174	3.123		
	Total	556.578	179			

Post Hoc Test (Duncan)

ความใส

		Subset for alpha = 0.05
Sample	N	1
6:4	30	6.5333
7:3	30	6.5333
3:7	30	6.7333
4:6	30	6.7667
5:5	30	6.9333
นนทบุรี	30	7.0000
Sig.		.274

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

สี

Sample	N	Subset for alpha = 0.05
		1
6:4	30	6.5000
4:6	30	6.5333
5:5	30	6.6000
นนทบุรี	30	6.6000
7:3	30	6.6667
3:7	30	6.8000
Sig.		.426

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

กลิ่น

Sample	N	Subset for alpha = 0.05
		1
นนทบุรี	30	4.7667
4:6	30	5.2667
5:5	30	5.3667
3:7	30	5.4667
7:3	30	5.5333
4:6	30	5.6667
Sig.		.060

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

รสชาติ

Sample	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
3:7	30	3.8000		
4:6	30	4.0667	4.0667	
7:3	30	4.5667	4.5667	4.5667
5:5	30	4.6333	4.6333	4.6333
6:4	30		4.9333	4.9333
นนทบุรี	30			5.0667
Sig.		.084	.072	.305

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

ความชอบโดยรวม

Sample	N	Subset for alpha = 0.05
		1
4:6	30	4.4000
3:7	30	4.7000
5:5	30	5.0667
6:4	30	5.0667
7:3	30	5.1000
นนทบุรี	30	5.1333
Sig.		.165

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

วันที่ 21

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ความใส	Between Groups	63.444	5	12.689	7.489	.000
	Within Groups	294.800	174	1.694		
	Total	358.244	179			
สี	Between Groups	43.044	5	8.609	4.962	.000
	Within Groups	301.867	174	1.735		
	Total	344.911	179			
กลิ่น	Between Groups	16.644	5	3.329	1.082	.372
	Within Groups	535.267	174	3.076		
	Total	551.911	179			
รสชาติ	Between Groups	52.178	5	10.436	3.204	.009
	Within Groups	566.800	174	3.257		
	Total	618.978	179			
ความชอบโดยรวม	Between Groups	77.844	5	15.569	4.875	.000
	Within Groups	555.733	174	3.194		
	Total	633.578	179			

Post Hoc Test (Duncan)

ความใส

Sample	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
7:3	30	4.8667	
6:4	30		6.1000
5:5	30		6.3000
3:7	30		6.5000
นนทบุรี	30		6.5333
4:6	30		6.5667
Sig.		1.000	.223

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

สี

Sample	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
7:3	30	5.0333	
6:4	30		6.1000
5:5	30		6.1333
3:7	30		6.2667
4:6	30		6.4333
นนทบุรี	30		6.5000
Sig.		1.000	.304

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

กลิ่น

Sample	N	Subset for alpha = 0.05
		1
7:3	30	4.5667
นนทบุรี	30	4.6333
4:6	30	5.1667
6:4	30	5.1667
3:7	30	5.3000
5:5	30	5.3000
Sig.		.162

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

รสชาติ

		Subset for alpha = 0.05	
Sample	N	1	2
4:6	30	3.6333	
3:7	30	3.7667	
7:3	30	4.1333	
5:5	30	4.3333	4.3333
6:4	30	4.6333	4.6333
นนทบุรี	30		5.2333
Sig.		.056	.069

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

ความชอบโดยรวม

		Subset for alpha = 0.05	
Sample	N	1	2
4:6	30	4.3000	
7:3	30	4.3000	
3:7	30	4.4333	
6:4	30	4.8000	
5:5	30	4.8333	
นนทบุรี	30		6.2000
Sig.		.312	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวปิยวรรณ วัชรอาภาไพบูลย์
วัน เดือน ปีเกิด	27 มิถุนายน 2536
ที่อยู่ปัจจุบัน	126 หมู่ที่ 4 ตำบลหนองม่วง อำเภอหนองม่วง จังหวัดลพบุรี
ประวัติการศึกษา	(2557) วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม เกรดเฉลี่ย 2.60 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (2562) วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ผลงานทางวิชาการ	Piyawan Watcharaapapaiboon, Tipachai Vatanavicharn and Duangjai Ochaikul. 2019. “ Isolation and selection of yeast and acetic acid bacteria from Kombucha tea fermentation” . *Proceeding of Science Research conference*. 1: 1429-1437.