โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การผลิต Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast (SCOBY) พร้อมใช้สำหรับหมักคอมบูชาและสมบัติการหมัก (Instant Kombucha Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast (SCOBY) and Fermentation Properties)

ชื่อนิสิต นางสาวชญาภรณ์ ตันติธรรม

นางสาวลลิตา เลิศโกวิทย์

ภาควิชา เทคโนโลยีทางอาหาร

ปีการศึกษา 2562

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การผลิต Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast (SCOBY) พร้อมใช้สำหรับหมักคอมบูชา และสมบัติการหมัก

โดย

นางสาวชญาภรณ์ ตันติธรรม
นางสาวลลิตา เลิศโกวิทย์

อาจารย์ที่ปรึกษา

รองศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร
ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ประจำปีการศึกษา 2562

Instant Kombucha Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast (SCOBY) and Fermentation Properties

Chayaporn Thanthithum

Lalita Lertkovit

Project Advisor

Associate Professor Cheunjit Prakitchaiwattana , Ph.D.

A Report Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

For the Degree of Bachelor of Science Program in Food Technology

Department of Food Technology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2019

หัวข้องานวิจัย การผลิต Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast (SCOBY) พร้อมใช้สำหรับหมักคอมบูชาและสมบัติการหมัก

โดย นางสาวชญาภรณ์ ตันติธรรม
นางสาวลลิตา เลิศโกวิทย์

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางอาหาร

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา

ปีการศึกษา 2562

ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
อนุมัติให้รายงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร
ประจำปีการศึกษา 2562

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ขนิษฐา ธนานุวงศ์)
หัวหน้าภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา)
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

หัวข้องานวิจัย การผลิต Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast (SCOBY) พร้อมใช้สำหรับหมักคอมบูชาและสมบัติการหมัก

โดย นางสาวชญาภรณ์ ตันติธรรม
นางสาวลลิตา เลิศโกวิทย์
สาขาวิชา เทคโนโลยีทางอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา

ปีการศึกษา 2562

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อคัดแยกจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการหมักคอมบูชาจากน้ำหมักสมุนไพรไทยอายุ 3 ปีและ 8 ปี และศึกษาคุณลักษณะและสมบัติการหมักคอมบูชาของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ (ไอโซเลต) เพื่อพัฒนาเป็นกล้าเชื้อสำหรับหมักคอมบูชา ผลการศึกษา พบว่า จุลินทรีย์ที่พบไม่มีความหลากหลายและคัดแยกตัวแทนได้ 3 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต A, B และ C โดย A และ C มีคุณลักษณะใกล้เคียงกัน คือ เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ovoid ผลทดสอบคะตะเลสเป็นบวก สร้างเซลลูโลสในน้ำชาหมักและพบ clear zone บน Acetobacter agar ซึ่งทั้งหมดเป็นคุณลักษณะของแบคทีเรียในตระกูล Acetobacteraceae ในขณะที่ B เป็นแบคทีเรียแกรมบวก short rod ผลทดสอบคะตะเลสเป็นลบ สร้างเซลลูโลสและพบ clear zone เมื่อทดสอบการหมักน้ำชาด้วยยีสต์ทางการค้า *Saccharomyces cerevisiae* Lalvin EC-1118 พบว่า ยีสต์สามารถหมักน้ำชาผสมน้ำตาลทรายเข้มข้น 10°Brix ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 9 วัน สร้างแอลกอฮอล์ประมาณ 12% เมื่อประเมินสมบัติการหมักคอมบูชาด้วยไอโซเลต 2 วิธี คือ การหมักแบบผสม (หมักด้วยยีสต์และไอโซเลตพร้อมกัน) และการหมักแบบเป็นลำดับ (เติมไอโซเลตในน้ำชาหลังหมักด้วยยีสต์ที่มีแอลกอฮอล์ 12%) พบว่า น้ำชาหมักที่ได้จากการหมักแบบผสมด้วยไอโซเลต A และ C มีสมบัติคล้ายกัน คือ น้ำชาหลังหมักมีปริมาณแอลกอฮอล์ 9% และมีค่า pH ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) จาก 4.9 เป็น 3.8 ส่วนการหมักด้วยไอโซเลต B พบว่า น้ำชาหลังหมักมีปริมาณแอลกอฮอล์ 12% และมีค่า pH ไม่แตกต่างจากค่าเริ่มต้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ในการหมักแบบเป็นลำดับ พบว่า หลังหมักน้ำชาด้วยยีสต์ให้มีแอลกอฮอล์ 12% แล้วจึงเติมไอโซเลต A และ C น้ำชาหมักที่ได้มีแอลกอฮอล์ลดลงเหลือ 4.8 และ 2.8% ตามลำดับ และมีค่า pH ลดลงเหลือ 4.12 และ 3.98 ตามลำดับ ในขณะที่การหมักด้วยไอโซเลต B น้ำหมักมีปริมาณแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้นเป็น 14% และค่า pH ลดลง อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) จากสมบัติการหมักบ่งชี้ว่า ไอโซเลต A และ C มีสมบัติการหมักแบบคอมบูชา กล่าวคือ สามารถหมักน้ำชาร่วมกับยีสต์แล้วเปลี่ยนแอลกอฮอล์ให้เป็นกรดได้ จึงเป็นจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพที่จะนำไปพัฒนาเป็นกล้าเชื้อคอมบูชาได้ทั้งการหมักแบบผสมและการหมักแบบเป็นลำดับ

Project Title	Instant Kombucha Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast (SCOBY) and Fermentaton Properties
Student	Chayaporn Thanthithum Lalita Lertkovit
Student Program	Bachelor of Science in Food Technology
Advisor	Associate Professor Cheunjit Prakitchaiwattana , Ph.D.
Academic Year	2019

ABSTRACT

This study aimed to isolate microbes associated to Kombucha fermentation from Thai traditional herbal beverages fermented for 3 years and 8 years. Morphology and fermentation properties of isolates were then investigated to further develop as starter for kombucha fermentation. Only 3 isolates including A, B and C, a represent of each microbial group were obtained. Isolates A and C had similar properties which were gram negative, ovoid, catalase positive, produced cellulose in tea fermentation and exhibited clear zone on Acetobacter agar. These characteristics indicated that the A and B isolates belong to the Acetobacteraceae family. Isolate B was different found as gram positive, short rod, catalase negative, produced cellulose and exhibited clear zone. Fermentation conditions of tea with commercial yeast *Saccharomyces cerevisiae* Lalvin EC-1118 was optimized and found that the yeast could ferment tea with 10°Brix concentrated sugar at 30°C for 9 days to produce alcohol around 12%. The Kombucha fermentation properties of three isolates were then tested. Two processes of fermentation, including mixed fermentation (fermentation with yeast a long with each isolate) and sequential fermentation (adding each isolate in post alcoholic tea fermentation having 12% alcohol), were evaluated. It was found that fermented tea obtained from mixed fermentation with isolates A and C had similar properties that alcohol was decreased to approximately 9% and pH significantly decreased ($p<0.05$) to 3.8. Tea fermented from yeast mixed with isolates B, alcohol increased to approximately 12% and pH was not different from the initial value. In sequential fermentations, teas contained 12% alcohol after fermented with A and C, alcohol decreased to approximately 4.8 and 2.8%, respectively and pH decreased to 4.12 and 3.98 respectively. While sequential fermentation with B, the alcohol increased to 14% and the pH decreased significantly ($p<0.05$). Based on fermentation properties in conversion of alcohol into acids and cellulose production ability, isolate A and C are potential to development as kombucha starters with both mixed and sequential fermentation processes.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาจาก รองศาสตราจารย์ ดร. ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษางานวิจัยที่ได้กรุณาให้ความรู้ ความช่วยเหลือ แนวคิด ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆในงานวิจัย ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง จนงานวิจัยนี้เสร็จสมบูรณ์ ผู้ทำงานวิจัยจึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบคุณพระเจ้าหน้าที่ควบคุมห้องปฏิบัติการ นิสิตปริญญาโท และนิสิตปริญญาเอก ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย รวมทั้งสละเวลาสอนใช้เครื่องมือปฏิบัติต่างๆ

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ คำปรึกษา และคอยสนับสนุนจนกระทั่งงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

คณะผู้จัดทำ

สารบัญ

หน้า

บทที่ 1 บทนำ **1**

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 1

1.3 ขอบเขต/กรอบแนวความคิดของการวิจัย 1

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย 2

บทที่ 2 แนวความคิดทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง **3**

2.1 คอมบูชา 3

2.1.1 องค์ประกอบทางเคมี 4

2.1.2 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการหมัก 4

2.2 กระบวนการหมักคอมบูชา 7

2.3 น้ำหมักสมุนไพรไทย 8

2.3.1 มะขามป้อม 9

2.3.2 ลูกยอ 9

2.3.3 สมอไทย 10

2.4 Symbiotic culture of bacteria and yeast (SCOBY) 11

บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการวิจัย **13**

3.1 วัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือ และ สารเคมี 13

3.1.1 วัสดุ 13

3.1.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ 13

3.1.3 สารเคมี 13

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย 14

3.2.1 การคัดแยกจุลินทรีย์จากน้ำหมักสมุนไพรไทย 14

3.2.2 ประเมินสภาวะการหมักน้ำชาแบบแอลกอฮอล์ด้วยยีสต์ทางการค้า 16

3.2.3 ประเมินสมบัติการหมักคอมบูชาด้วยไอโซเลตที่คัดแยกได้ 18

บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล **21**

4.1 การคัดแยกจุลินทรีย์จากน้ำหมักสมุนไพรไทย 21

4.2 ประเมินสภาวะการหมักน้ำชาแบบแอลกอฮอล์ด้วยยีสต์ทางการค้า 26

4.3 ประเมินสมบัติการหมักคอมบูชาด้วยไอโซเลตที่คัดแยกได้ 31

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย **34**

5.1 การคัดแยกจุลินทรีย์จากน้ำหมักสมุนไพรไทย 34

5.2 ประเมินสภาวะการหมักน้ำชาแบบแอลกอฮอล์ด้วยยีสต์ทางการค้า 34

5.3 ประเมินสมบัติการหมักคอมบูชาด้วยไอโซเลตที่คัดแยกได้ 34

บรรณานุกรม **35**

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก. 39

ภาคผนวก ข. 42
ประวัติผู้วิจัย **50**

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	คุณภาพของคอมบูชาที่ต้องการ โดยสำนักงานมาตรฐานแห่งชาติยูกันดา (Uganda National Bereau of Standard, UNBS)	3
2.2	องค์ประกอบทางเคมีและประโยชน์ที่สำคัญของลูกยอ	10
4.1	จำนวนจุลินทรีย์และลักษณะโคโลนีที่พบในตัวอย่างน้ำหมักสมุนไพรที่หมักเป็นเวลา 3 ปี ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด	22
4.2	จำนวนจุลินทรีย์และลักษณะโคโลนีที่พบในตัวอย่างน้ำหมักสมุนไพรที่หมักเป็นเวลา 8 ปี ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด	23
4.3	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และผลการทดสอบการสร้างคะตะเลส (Catalase test) ของไอโซเลตที่คัดแยกได้	25
4.3	แกรมแบคทีเรียที่คัดแยกได้	25
4.4	การเปลี่ยนแปลงของการเจริญเติบโตของยีสต์ (Populations) ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำ (Total soluble solids หรือ TSS) ปริมาณแอลกอฮอล์ (% Alcohol) ในระหว่างการหมักน้ำชา ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน	28
4.5	การเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH) และปริมาณกรดที่ไตเตรตได้ (Titratable acidity หรือ TA) ในระหว่างการหมักน้ำชา ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน	30
4.6	การเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH) ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำ (Total soluble solids หรือ TSS) และปริมาณแอลกอฮอล์ (% Alcohol) ในระหว่างการหมักน้ำชาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน	32

สารบัญรูปภาพ

รูปที่		หน้า
2.1	กระบวนการเผาผลาญของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ในสภาวะปราศจากออกซิเจน	5
2.2	บทบาทที่สำคัญของ *Saccharomyces cerevisiae*	5
2.3	กระบวนการหมักคอมบูชา	7
2.4	วิธีการมาตรฐานในการหมักคอมบูชา	8
2.5	Tea fungus หรือ SCOBY	11
2.6	การกระจายของประชากรจุลินทรีย์ใน SCOBY	12
3.1	การคัดแยกจุลินทรีย์จากตัวอย่าง	15
3.2	การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้	16
3.3	การเตรียมน้ำชาพร้อมหมัก	16
3.4	การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์ทางการค้า	17
3.5	การประเมินสภาวะการหมักน้ำชาด้วยยีสต์ทางการค้า	18
3.6	การเตรียมกล้าเชื้อไอโซเลตสำหรับทดสอบสมบัติการหมักคอมบูชา	19
3.7	การหมักคอมบูชาแบบผสม	19
3.8	การหมักคอมบูชาแบบเป็นลำดับ	20
4.1	การสร้างเซลลูโลสของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ในน้ำชา 1% (w/v) เติมน้ำตาลทรายเข้มข้น 1% (w/v) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 สัปดาห์	26
4.2	การเปลี่ยนแปลงการเจริญของยีสต์ (Populations) ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำ (Total soluble solids หรือ TSS) และปริมาณแอลกอฮอล์ (% Alcohol) ระหว่างการหมักน้ำชาโดยใช้ยีสต์ทางการค้า *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ Lalvin รหัส EC-1118 ที่มีค่า TSS เริ่มต้น 10 °Brix หมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน	29
4.3	การเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH) และปริมาณกรดที่ไตเตรตได้ (Titratable acidity หรือ TA) ในระหว่างการหมักน้ำชาโดยใช้ยีสต์ทางการค้า *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ Lalvin รหัส EC-1118 ที่มีค่า TSS เริ่มต้น 10 °Brix หมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน	30
4.4	การเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH) ในระหว่างการหมักน้ำชาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน	32
4.5	การเปลี่ยนแปลงของปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำ (Total soluble solids หรือ TSS) ในระหว่างการหมักน้ำชา ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน	33
4.6	การเปลี่ยนแปลงของปริมาณแอลกอฮอล์ (% Alcohol) ในระหว่างการหมักน้ำชาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน	33
ผ.1	จานอาหารวุ้น PDA	39
ผ.2	การทดสอบด้วย Vinometer	40
ผ.3	ผลของ Catalase test	41

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ปัจจุบันผลิตภัณฑ์คอมบูชา (Kombucha) มีการบริโภคเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากมีคุณสมบัติที่หลากหลาย อุดมไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระและกรดอินทรีย์อื่นๆ ซึ่งสามารถล้างพิษสารพิษที่ก่อให้เกิดโรค (Al-dulaimi *et al*., 2018) คอมบูชานั้นมีส่วนช่วยในการต่อสู้กับโรค Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) (Jung *et al*., 2018)

ผลิตภัณฑ์คอมบูชา (Kombucha) เป็นเครื่องดื่มหมักที่ผลิตจากการหมักน้ำตาลในน้ำชาซึ่งโดยทั่วไปเป็นชาดำ ด้วยกลุ่มจุลินทรีย์ที่ประกอบด้วยแบคทีเรียและยีสต์หลายชนิด จุลินทรีย์เหล่านี้อยู่ร่วมกันในสภาวะ Symbiosis โดยสภาวะนี้นำไปสู่การก่อตัวของพอลิเมอร์ของเซลลูโลสโดยแบคทีเรียกลุ่ม *Acetobacter* spp. เรียกพอลิเมอร์นี้ว่า Symbiotic culture of bacteria and yeast (SCOBY) หรือ Tea fungus (Roos and Vuyst, 2018)

ในท้องตลาดมีผลิตภัณฑ์คอมบูชาขายอย่างแพร่หลายในรูปแบบเครื่องดื่มพาสเจอไรส์ และชาสดพร้อม SCOBY ซึ่งยากต่อการเก็บรักษา อย่างไรก็ตามในการผลิตคอมบูชาและการควบคุมให้ SCOBY เสถียรมีความสำคัญ โดยเฉพาะการนำไปใช้ในอุตสาหกรรม ผู้วิจัยจึงต้องการที่จะพัฒนา SCOBY ให้มีชนิดของจุลินทรีย์ที่ได้จาก Pure culture ที่ผ่านการคัดเลือกแล้วในสัดส่วนที่เหมาะสมมาใช้เป็นกล้าเชื้อพร้อมใช้ ทำให้การหมักสมบูรณ์รวดเร็วมากขึ้น และสามารถเก็บรักษาได้ง่าย

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดแยกจุลินทรีย์จากน้ำหมักสมุนไพรไทยที่มี SCOBY เกิดขึ้นระหว่างการหมัก
2. เพื่อศึกษาสมบัติการหมักน้ำชาของยีสต์ทางการค้า
3. เพื่อศึกษาสมบัติการหมักคอมบูชาด้วยไอโซเลตทั้งการหมักแบบผสมและการหมักแบบเป็นลำดับ

1.3 ขอบเขต/กรอบแนวคิดของการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาตามวัตถุประสงค์ข้างต้น โดยน้ำหมักสมุนไพรไทยในการศึกษาประกอบด้วย มะขามป้อม ลูกยอ และสมอไทย การคัดแยกจุลินทรีย์จากน้ำหมักสมุนไพรไทยอายุ 3 และ 8 ปี เตรียมตัวอย่างน้ำหมักสมุนไพร 3 แบบ คือ Symbiotic culture of bacteria and yeast (SCOBY), น้ำหมักตีปั่นกับ SCOBY และน้ำหมักสมุนไพร เจือจางตัวอย่างที่ความเข้มข้น 10^{-1} และ 10^{-2} คัดแยกด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 แบบ ได้แก่ Nutrient agar (NA), Potato dextrose agar (PDA) และ Acetobacter agar แล้วเลือกตัวแทนโคโลนีมาเพาะเลี้ยงใน Nutrient broth (NB), Yeast Malt broth (YMB) และ MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ก่อนนำไปขีด (Streak) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Acetobacter agar แล้วนำไอโซเลตที่ได้ไปศึกษาสัณฐานวิทยา ย้อมแกรม ทดสอบคะตะเลส (Catalase test) และทดสอบการสร้างเซลลูโลส

แล้วเก็บไอโซเลตที่ได้ไว้ใน Glycerol stock เพื่อประเมินสมบัติการหมักต่อไป จากนั้นประเมินสภาวะการหมักน้ำชาแบบแอลกอฮอล์ด้วยยีสต์ทางการค้า *Saccharomyces cerevisiae* Lalvin EC-1118 น้ำชาที่ใช้หมักมีปริมาณชาเริ่มต้น 12 g/L ผสมน้ำตาลเข้มข้น 10 °Brix บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน ติดตามการเปลี่ยนแปลงของการเจริญเติบโตของยีสต์ และปริมาณกรดที่ไตเตรตได้ (Titratable acidity หรือ TA) ทุก 2 วัน และติดตามการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH) ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำ (Total soluble solids หรือ TSS) และปริมาณแอลกอฮอล์ (% Alcohol) ทุกวัน เพื่อศึกษาสมบัติการหมักของยีสต์ก่อนนำไปหมักร่วมกับจุลินทรีย์ไอโซเลตที่คัดแยกได้แบบเป็นลำดับ (Sequential fermentation) จากนั้นประเมินสมบัติการหมักคอมบูชาด้วยไอโซเลตที่คัดแยกได้ โดยนำไอโซเลตที่ได้มาทดสอบคุณสมบัติการหมักด้วยวิธีการหมัก 2 แบบ ได้แก่ การหมักแบบผสม (Mixed cultured fermentation) และการหมักแบบเป็นลำดับ (Sequential fermentation) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน แล้วติดตามค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH) ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำ (Total soluble solids หรือ TSS) และปริมาณแอลกอฮอล์ (% Alcohol) ทุก 7 วัน

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบวิธีการทำกล้าเชื้อสำเร็จรูปและขั้นตอนวิธีการหมักคอมบูชา
2. เพิ่มมูลค่าให้กับผลิตภัณฑ์ชา

บทที่ 2 แนวคิดทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 คอมบูชา

ในยุคราชวงศ์ฉินประมาณ 220 ปีก่อนคริสตกาล ทางตอนเหนือของประเทศจีนนิยมดื่มคอมบูชาเพื่อให้พลังงานและกำจัดสารพิษในร่างกาย ต่อมาแพทย์ชื่อ “คอมบู” ได้นำเข้ามาในประเทศญี่ปุ่นเพื่อรักษาอาการเกี่ยวกับปัญหาระบบย่อยอาหารของจักรพรรดิอิงเงียว ซึ่งชื่อของคอมบูชามาจากเหตุการณ์นี้ โดยเพิ่มคำว่า ชา ข้างหลังชื่อแพทย์คอมบู ความนิยมของคอมบูชาแผ่ขยายมายังรัสเซียในชื่อ “Mo-Gu” ผ่านทางการค้า ในรัสเซียมีชื่อเรียกหลายชื่อ เช่น Jsakvasska, Kambucha, Japonskigrib, Cainii kvass และ Cainiigrib เป็นต้น ในศตวรรษที่ 20 เริ่มได้รับความนิยมในยุโรปตะวันออกหลายประเทศ คอมบูชาเป็นที่รู้จักในประเทศเยอรมัน ในชื่อ Heldenpilz และ Kombuchaschwamm ในระหว่างสงครามโลกครั้งที่ 2 ปี 1950 คอมบูชาได้รับความนิยมในฝรั่งเศส และแอฟริกาเหนือ การดื่มคอมบูชาเป็นกิจวัตรประจำวันในยุโรปจนส่งผลให้ใบชาและน้ำตาลขาดแคลน แสดงถึงการเป็นที่ยอมรับอย่างแพร่หลายของคอมบูชา ภายหลังสงครามโลกครั้งที่ 2 คอมบูชาเป็นที่นิยมในอิตาลีในชื่อ Funkochinese ในช่วงปี 1960 นักวิจัยชาวสวิตเซอร์แลนด์รายงานว่า การดื่มคอมบูชานั้นมีประโยชน์เช่นเดียวกับการดื่มโยเกิร์ต รายงานดังกล่าวเพิ่มความนิยมของคอมบูชาเป็นอย่างมาก ทำให้คอมบูชาเป็นที่นิยมเนื่องมาจากมีประโยชน์ต่อสุขภาพ และวิธีทำง่ายสามารถทำได้ภายในครัวเรือนโดยอาศัยความรู้ทางวิทยาศาสตร์เพียงเล็กน้อย (Jayabalan *et al.*, 2016)

คอมบูชา (Kombucha) เป็นเครื่องดื่มหมักที่ผลิตจากการหมักน้ำตาลในน้ำชาซึ่งโดยทั่วไปเป็นชาดำด้วยกลุ่มจุลินทรีย์ที่ประกอบด้วยแบคทีเรียและยีสต์หลายชนิด จุลินทรีย์เหล่านี้อยู่ร่วมกันในสภาวะ symbiosis สภาวะนี้นำไปสู่การก่อตัวของพอลิเมอร์ของเซลลูโลสโดยแบคทีเรียกลุ่ม *Acetobacter* spp. เรียกพอลิเมอร์นี้ว่า SCOBY (Symbiotic culture of bacteria and yeast) หรือ tea fungus (Roos and Vuyst, 2018)

คุณภาพของคอมบูชาตามสำนักงานมาตรฐานแห่งชาติยูกันดา (Uganda National Bereau of Standard, UNBS) กำหนดดังตาราง

ตารางที่ 2.1 คุณภาพของคอมบูชาที่ต้องการ โดยสำนักงานมาตรฐานแห่งชาติยูกันดา (Uganda National Bereau of Standard, UNBS)

Characteristic	Requirement		Test method
	Non Alcoholic Kombucha	Alcoholic Kombucha	
Alcohol content, %, (v/v), max	0.5	0.5 - 15	US EAS 104
Acidity as acetic acid, g/L max	2		US ISO 1842
Acidity as lactic acid, g/L max	4 - 15		US ISO 750
Total sugar as invert sugar, g/L max	50		US EAS 104

2.1.1 องค์ประกอบทางเคมี

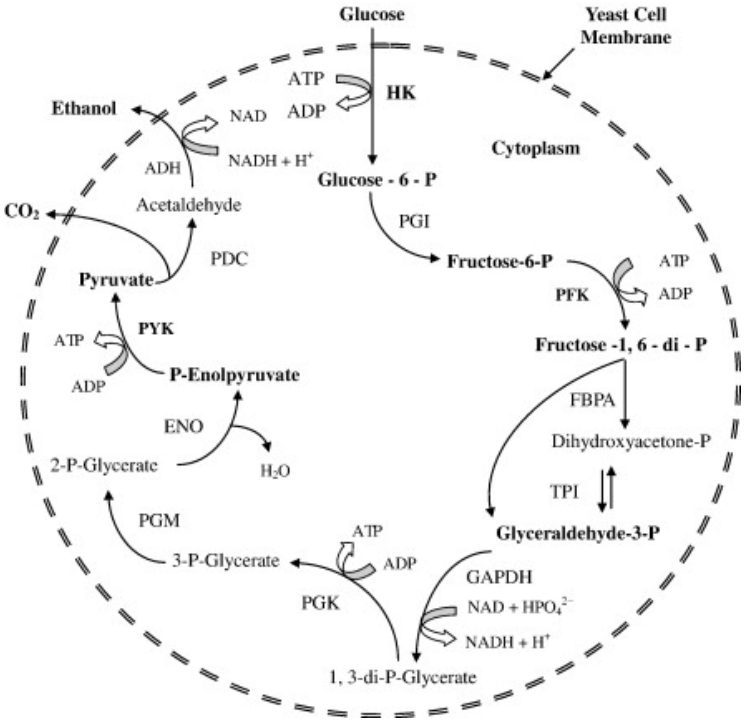
องค์ประกอบทางเคมีของคอมบูชาขึ้นอยู่กับแหล่งหัวเชื้อ ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลในน้ำชา ระยะเวลาการหมัก และอุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก Villarreal-Soto *et al*. (2018) กล่าวว่า องค์ประกอบทางเคมีที่พบในคอมบูชา มีดังนี้

- สารเมตาบอไลท์กรดอินทรีย์ ได้แก่ acetic acid, gluconic acid, glucuronic acid และ lactic acid โดยกรดอินทรีย์ที่มีความสำคัญ คือ glucuronic acid เนื่องจากมีคุณสมบัติทางด้านการรักษาโรคในมนุษย์
- วิตามิน ได้แก่ วิตามิน B1, B2, B6, B12 และ C
- สารที่ระเหยได้และระเหยไม่ได้ ได้แก่ ethanol, protein และtea polyphenols
- แร่ธาตุ ได้แก่ Cu, Fe, Mn, Ni และ Zn
- Anions ได้แก่ F^-, Cl^-, Br^-, I^-, NO_3^-, HPO_4^- และ SO_4^-

2.1.2 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการหมัก

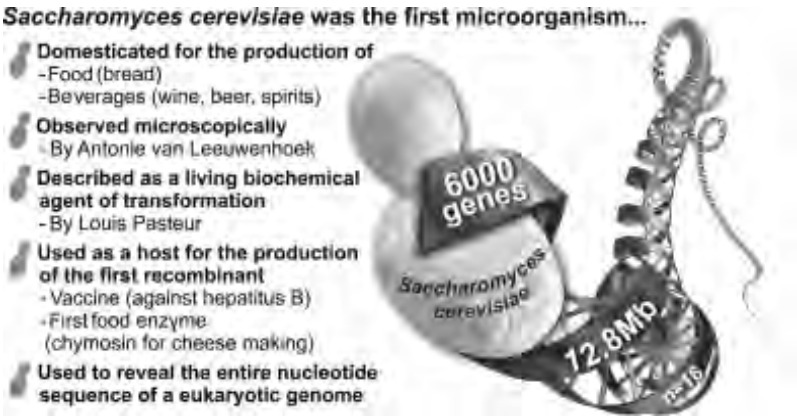
- Yeasts เป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวในอาณาจักรฟังไจ เซลล์มีลักษณะหลายแบบกลมจนถึงแบบรี สืบพันธุ์โดยการแตกหน่อหรือการแบ่งออกเป็นสอง ไม่สร้างสปอร์ สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีและปราศจากออกซิเจน และส่วนมากเจริญเติบโตได้ดีในของเหลวที่มีสภาวะเป็นกรด ในคอมบูชาประกอบด้วยยีสต์หลายสกุล หลายสปีชีส์ ได้แก่ *Zygosaccharomyces*, *Candida*, *Kloeckera/Hanseniaspora*, *Torulaspora*, *Pichia*, *BreTAnomyces/Dekkera*, *Saccharomyces*, *Lachancea*, *Saccharomycoides*, *Schizosaccharomyces* และ *Kluyveromyces* (Villarreal-Soto *et al*., 2018)

Saccharomyces cerevisiae เป็นยีสต์ที่สามารถพบได้ทั่วไปตามธรรมชาติและพบได้ในพืช ผลไม้ และในดิน (Kwon-Chung and Bennett, 1992) เซลล์มีลักษณะเป็นแบบ cocci และ ovoid สีครีม S. *cerevisiae* มีบทบาทอย่างมากในผลิตภัณฑ์อาหารหมักจึงทำให้มักเรียกว่าเป็น brewer's หรือ baker's yeast เนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้อง คือ เบียร์ ไวน์ และขนมอบ ในกระบวนการหมักเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ S. *cerevisiae* มีคุณสมบัติที่โดดเด่น คือ สามารถผลิต ethanol ได้ในปริมาณสูง (Philp and Atlas, 2017) มีอัตราการหมักที่รวดเร็ว (Choonut *et al.*, 2014) โดยในสภาวะปราศจากออกซิเจน ยีสต์จะเผาผลาญน้ำตาลด้วยกระบวนการ glycolysis ผลิตแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) และ ethanol ดังแสดงในรูปที่ 2.1 (Bai *et al.*, 2008)



รูปที่ 2.1 กระบวนการเผาผลาญของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ในสภาวะปราศจากออกซิเจน (ที่มา : Bai *et al.*, 2008)

S. *cerevisiae* สามารถทนต่อสภาวะแวดล้อมที่หลากหลาย (Goddard and Greig 2015) และ Farid *et al.*(2019) กล่าวว่า S. *cerevisiae* มีประโยชน์ในการรักษาอาการต่าง ๆ เช่นโรคเกี่ยวกับระบบทางเดินหายใจ โรคหัวใจและหลอดเลือด และโรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง อีกทั้งสามารถนำไปปรับใช้กับยาอาหารและอาหารเสริมอื่น ๆ ได้ และสรุปบทบาทที่สำคัญของ *Saccharomyces cerevisiae* ดังแสดงในรูปที่ 2.2



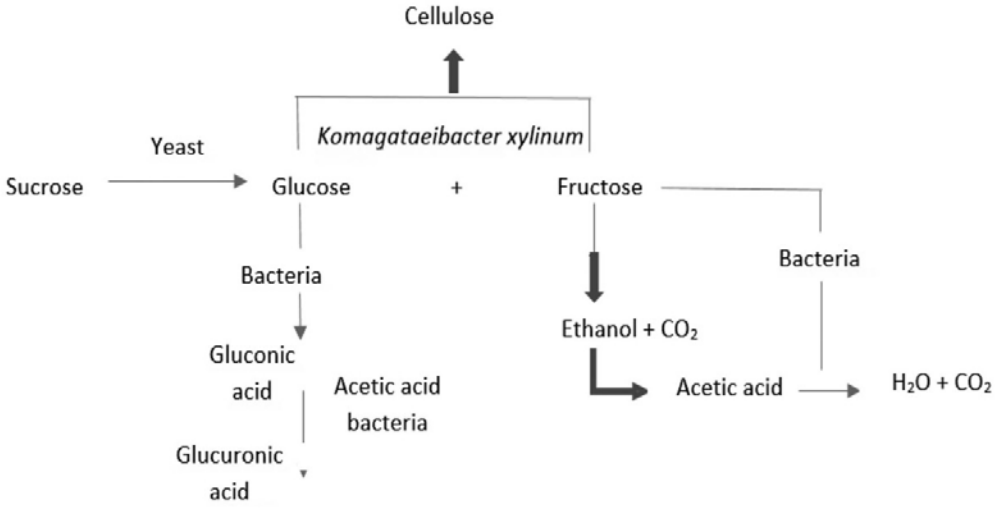
รูปที่ 2.2 บทบาทที่สำคัญของ *Saccharomyces cerevisiae* (ที่มา: Pretorius *et al.*, 2015)

- Acetic acid bacteria (AAB) เป็นแบคทีเรียจัดอยู่ในตระกูล Acetobacteraceae มีลักษณะรูปร่างเซลล์เป็นแบบ ovoid และ rod ย้อมติดสีแกรมลบ เจริญเติบโตในสภาวะที่มีออกซิเจน อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ที่ 15-34 องศาเซลเซียส (Deley and Frateur, 1974) pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ที่ 5-6 แต่สามารถเจริญที่ pH ต่ำกว่านี้ได้ขึ้นกับสปีชีส์ และสามารถทนต่อ ethanol ได้ในช่วงกว้างตั้งแต่ 5-13% ขึ้นกับสปีชีส์ (Guillamon and Mas, 2011) สามารถออกซิไดซ์ ethanol ผลิต acetic acid และกรดอินทรีย์อื่นๆ บางสปีชีส์สามารถสร้างเซลลูโลสได้

Villarrreal-Soto *et al*. (2018) กล่าวว่า AAB ที่พบในคอมบูชา ได้แก่ *Acetobacter xylinoides*, *Bacterium gluconicum*, *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus*, *Gluconobacter oxydans, Gluconacetobacter xylinus* และ *Komagataeibacter xylinus* โดยแบคทีเรียที่พบในกระบวนการหมักคอมบูชาส่วนใหญ่ คือ *Gluconobacter* ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มนี้ทำหน้าที่สร้างเซลลูโลสทำให้มีลักษณะเป็นแผ่นเจล เรียกว่า SCOBY ซึ่ง SCOBY ดังกล่าวนิยมนำมาทำเป็นกล้าเชื้อในการหมักคอมบูชาแบบธรรมชาติ

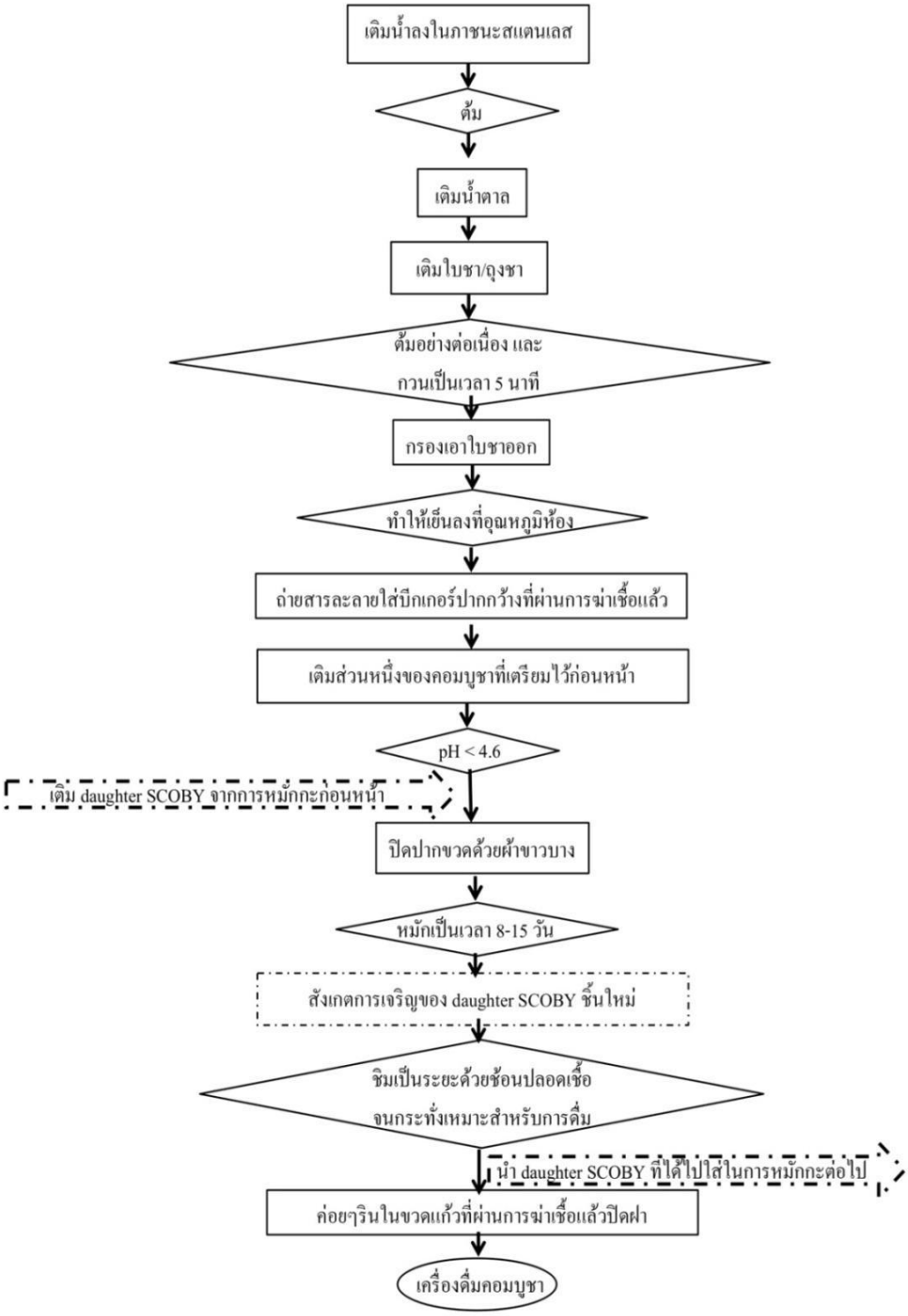
2.2 กระบวนการหมักคอมบูชา

กระบวนการหมักคอมบูชาประกอบไปด้วย 2 กระบวนการหลักที่ดำเนินการโดยจุลินทรีย์ คือ ยีสต์หมักน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ และแบคทีเรียออกซิไดซ์ ethanol ผลิต acetic acid (Kumar and Joshi, 2016) ดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 กระบวนการหมักคอมบูชา
(ที่มา: Villarreal-Soto *et al*., 2018)

กระบวนการหมักคอมบูชาตามวิธีการมาตรฐานเสนอโดย Jayabalan *et al.* (2014) เริ่มต้นจากต้มน้ำในภาชนะสแตนเลส แล้วเติมน้ำตาลและเติมใบชาหรือถุงชาลงไป ต้มอย่างต่อเนื่องและกวนเป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงกรองเอาใบชาออก ทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้องก่อนถ่ายสารละลายลงในบีกเกอร์ปากกว้างที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นเติมส่วนหนึ่งของคอมบูชาที่เตรียมไว้ก่อนหน้าเพื่อปรับ pH ให้ต่ำกว่า 4.6 จากนั้นจึงเติม daughter SCOBY จากการหมักก่อนหน้า แล้วปิดปากขวดด้วยผ้าขาวบาง หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 8-15 วัน สังเกตการณ์เจริญของ daughter SCOBY ชิ้นใหม่ ชิมเป็นระยะด้วยช้อนปลอดเชื้อ จนกระทั่งเหมาะสำหรับการดื่ม นำ daughter SCOBY ที่ได้ไปเติมในการหมักกะต่อไป ค่อยๆรินลงในขวดแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปิดฝา ได้เป็นเครื่องดื่มคอมบูชา ดังแสดงในรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 วิธีการมาตรฐานในการหมักคอมบูชา
(ที่มา: Jayabalan *et al*., 2014)

2.3 น้ำหมักสมุนไพรไทย

น้ำหมักสมุนไพร ตามความหมายของมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน (มผช. 481/2547) หมายถึง เครื่องดื่มที่ได้จากการนำส่วนใดส่วนหนึ่งของพืชชนิดเดียว หรือหลายชนิด ที่สดหรือแห้ง ซึ่งวัตถุดิบที่นิยมใช้ เช่น ลูกยอ ลูกสมอไทย เหง้ากระชายดำ ผลมะขามป้อม และผลมะเม่า เป็นต้น ที่ยังอยู่ในสภาพดี มาล้างให้

สะอาด แล้วนำมาหมัก โดยคุณลักษณะของน้ำหมักสมุนไพร ต้องเป็นของเหลวอาจมีชิ้นเนื้อพืชปนอยู่เล็กน้อย และอาจตกตะกอนเมื่อวางทิ้งไว้ มีสี กลิ่น รสที่ดีตามธรรมชาติของส่วนประกอบที่ใช้ น้ำหมักสมุนไพรอาจจะรู้จักกันในชื่ออื่น เช่นน้ำหมักชีวภาพ น้ำหมักพืช น้ำเอนไซม์ น้ำหมักโพรไบโอติก ซึ่งเป็นที่ได้จากการหมักพืช ผัก ผลไม้ รวมทั้งสมุนไพรกับสารให้ความหวาน (ปิ่นมณี ขวัญเมือง, 2561)

2.3.1 มะขามป้อม

มะขามป้อม มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ คือ *Phyllanthus emblica* Linn. จัดอยู่ในวงศ์ Euphorbiceae เป็นไม้ยืนต้น ออกดอกช่วงเดือนมกราคม ถึง เมษายน ฤดูเก็บเกี่ยวประมาณเดือนธันวาคม และสามารถเก็บเกี่ยวได้จนถึงมีนาคม โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงคุณภาพ มีถิ่นกำเนิดอยู่ใน เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และป่าเบญจพรรณแล้ง ส่วนประกอบทางเคมีของผล ได้แก่ เนื้อผล 90.97 % ของผล ประกอบไปด้วยความชื้น 70.5 % ภายในมีส่วนเป็นกรด 3.28 % น้ำตาลทั้งหมด 5.09 % โดยเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ 5.08 % โปรตีน 0.75 % ไขมัน 0.5 % คาร์โบไฮเดรต 0.1 % มีเพคติน เควอซิทิน และแทนนินจำนวนมาก และแร่ธาตุ ฟอสฟอรัส 0.027 % โพแทสเซียม 0.368 % แคลเซียม 0.059 % แมกนีเซียม 0.248 % และเหล็ก 0.004 % ส่วนเปลือกมีกรดเอลลาจิก กรดฟิลเลมลิกและสารประกอบฟีนอล มะขามป้อมมีฤทธิ์ในทางการรักษาที่หลากหลาย และใช้เป็นยารักษาโรคในท้องถิ่นต่างๆ (ภัทชราวดี สโมสร, 2547)

2.3.2 ลูกยอ

ลูกยอ (Noni) ชื่อทางวิทยาศาสตร์ คือ *Morinda Citrifolia* Linn. เป็นพืชสมุนไพรและเป็นพืชมงคล มีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศอินเดีย นิยมปลูกในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เป็นไม้ยืนต้นเล็กขนาดเล็ก สูงประมาณ 2-3 เมตร เจริญเติบโตได้เองตามธรรมชาติในแถบทะเลอันดามัน สามารถนำมาใช้ได้ทั้งใบ ราก ดอก และผล (วิชัย ราพฤทธิ์ และ ศรัญญา อำนักมณี, 2547) ลูกยอมีองค์ประกอบหลักทางเคมีและประโยชน์ที่สำคัญ ดังที่แสดงในตารางที่ 1 ส่วนผลของลูกยอประกอบด้วย ปริมาณน้ำ 91%, คาร์โบไฮเดรต 9.60% โปรตีน 2.50% ไขมัน 0.30% ใยอาหาร 1.00% และประกอบด้วยแร่ธาตุ ได้แก่ โซเดียม 19.70 mg/100 g และโพแทสเซียม 5012 mg/100 g ส่วนองค์ประกอบของน้ำลูกยอ ได้แก่ โพแทสเซียม 0.25 g/100 g กำมะถัน 0.30 g/100 g แคลเซียม 0.29 g/100 g ฟอสฟอรัส 0.25 g/100 g ซีลีเนียม 0.90 µg/g วิตามินซี 101.41 mg/100 g และโปรวิตามิน (Lopes et al., 2018)

ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบทางเคมีและประโยชน์ที่สำคัญของลูกยอ

องค์ประกอบ	ประโยชน์
กรดอะมิโน	ช่วยให้การสังเคราะห์โปรตีนสมบูรณ์ เสริมระบบการ สร้างกล้ามเนื้อเนื้อเยื่อ ระบบไหลเวียนโลหิต
กรดไลโนเลอิก	ช่วยดูแลรักษาสุขภาพผิว เซลล์ประสาทเนื้อเยื่อหัวใจและ เส้นเลือด
สโคโปเลติน	ช่วยต้านการอักเสบ เชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา ช่วยลดความ ดันโลหิต ทำให้การนอนหลับดีขึ้น
แอนทราควิโนน	ช่วยควบคุมการติดเชื้อแบคทีเรีย เช่น *Staphylococcus aureus*
เทอร์ปีน	ช่วยส่งเสริมการสร้างเซลล์ในร่างกาย
เบต้า-ซิโตสเตอรอล	ช่วยลดคลอเลสเตอรอลในเส้นเลือด ช่วยผู้มีปัญหาต่อมลูกหมากโต และกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน
แอสปรูโลไซต์	ช่วยลดการเกร็งตัวของกระเพาะและลำไส้ ช่วยแก้อาการอาเจียน แก้อักเสบต่อต้านอนุมูลอิสระ
เพคติน	ช่วยลดการดูดซึมไขมัน และน้ำตาลในลำไส้
ยูจีนอล	ช่วยลดอาการเกร็งตัวของกล้ามเนื้อเรียบ
กรดยูโซลิก	ช่วยต้าน histamine แก้แพ้ต้านมะเร็ง หรือเนื้อร้าย
กรดแอสคอร์บิก	เป็นแหล่งสำคัญของวิตามินซีที่มีปริมาณมากพอที่ ร่างกายต้องการ
สารพฤกษเคมี	ช่วยในการต่อต้านอนุมูลอิสระ
ไกลโคไซด์	ช่วยขับปัสสาวะ ช่วยบำบัดอาการอักเสบ
Polysaccharides	ช่วยเพิ่มจำนวน และกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน

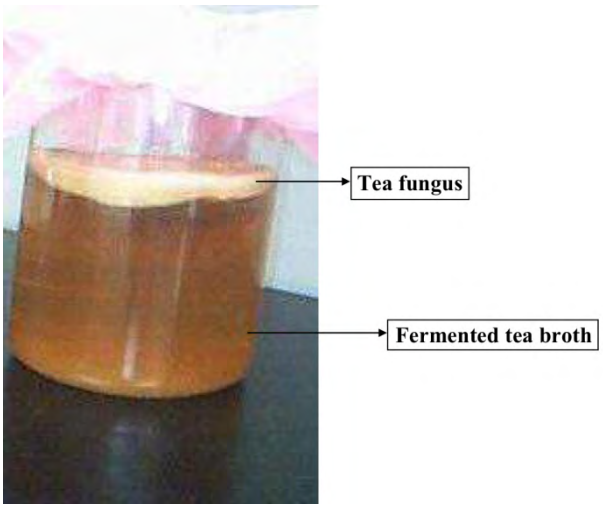
(สาคร ทองหล้า, 2555)

2.3.3 สมอไทย

สมอไทย ชื่อทางวิทยาศาสตร์ *Terminalia chebula* Retz. เป็นพืชในวงศ์ Combretaceae เป็นต้นไม้ผลัดใบขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ดอกมีสีเหลืองเหลืองเข้ม และมีกลิ่นเหม็น ผลมีความยาว 3-6 เซนติเมตร รูปทรงไข่สีเหลืองแกมเขียว สามารถเติบโตได้ในดินที่หลากหลาย มีแหล่งกำเนิดในอินเดียและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (ณพัฐอร บัวฉุน และคณะ, 2561) ส่วนประกอบในพืชมีหลายชนิด เช่น แทนนิน ฟลาโวนอยด์ สเตอรอล กรดอะมิโน ฟรุกโตส เรซิน และน้ำมัน โดยส่วนประกอบหลักประกอบด้วยแทนนินประมาณ 32% (Gupta, 2011) และในผลสมอไทยมีสามประกอบฟีโนลิกปริมาณสูง เช่น กรดแกลลิก กรดเอลลาจิก กรดชิบูลิก และคอริลาจิน เป็นต้น ซึ่งสารประกอบเหล่านี้ มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ และสามารถนำมาใช้ในการรักษาโรคและอาการต่างๆได้

2.4 Symbiotic culture of bacteria and yeast (SCOBY)

SCOBY หรือ tea fungus เป็นชื่อเรียกการเจริญเติบโตแบบภาวะพึ่งพาระหว่างแบคทีเรียกรดอะซิติก (*Acetobacter xylium, Acetobacter xylinoides, Bacterium gluconicum, Acetobacter aceti, and Acetobacter pasteurianus*) และยีสต์ (*Schizosaccharomyces pombe, Saccharomyces ludwigii, Kloeckera apiculata, Saccharomyces cerevisiae, Zygosaccharomyces rouxii, Zygosaccharomyces bailii, Brettanomyces bruxellensis, Brettanomyces custersii, Pichia membranaefaciens, Torulopsis,* and *Candida*) ภายในวุ้นที่หมักอยู่ในน้ำชาหมัก ซึ่งการหมักน้ำชาผสมน้ำตาลด้วย SCOBY ได้เป็นเครื่องดื่มคอมบูชา ซึ่งในระหว่างการหมักน้ำชาผสมน้ำตาล SCOBY เปลี่ยนน้ำตาลเป็นกรดอินทรีย์และแอลกอฮอล์ นอกจากนี้ SCOBY ใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนในการสร้างวุ้นใหม่ ซึ่งสามารถน้ำวุ้นใหม่นี้ไปหมักในกะถัดไปได้ แบคทีเรียกรดอะซิติกสร้างวุ้นเซลลูโลสลอยตัวอยู่บนผิวหน้าของน้ำชาหมัก เรียกว่า SCOBY หรือ Tea fungus ภายในวุ้นเซลลูโลสประกอบไปด้วยแบคทีเรียกรดอะซิติกและยีสต์ ซึ่งวุ้นเซลลูโลสนี้มีลักษณะเดียวกันกับ Mother of vinegar (Jayabalan *et al.*, 2010) ดังรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 Tea fungus หรือ SCOBY
(ที่มา: Jayabalan *et al.*, 2014)

การอยู่ร่วมกันแบบภาวะพึ่งพาของแบคทีเรียกรดอะซิติกและยีสต์ในวุ้น SCOBY สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ ซึ่งสปีชีส์ของแบคทีเรียกรดอะซิติกและยีสต์ขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของ SCOBY (Dutta and Paul, 2019) จากงานวิจัยของ Marsh *et al.* (2014) การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของจุลินทรีย์ใน SCOBY 5 แหล่งที่มา จากประเทศแคนาดา ประเทศอังกฤษ ประเทศสหรัฐอเมริกา และประเทศไอร์แลนด์ พบว่า ใน SCOBY ทั้ง 5 แหล่ง แบคทีเรียที่พบมากที่สุด คือ *Gluconacetobacter* spp. รองลงมา คือ *Lactobacillus* spp. และยีสต์ที่พบมากที่สุด คือ *Zygosaccharomyces* spp. ดังแสดงในรูปที่ 2.6

รูปที่ 2.6 การกระจายของประชากรจุลินทรีย์ใน SCOBY

(ที่มา: Marsh *et al.*, 2014)

บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมี

3.1.1 วัสดุ

- น้ำหมักสมุนไพรไทยอายุ 3 ปีและ 8 ปี ผลิตในครัวเรือน
- ชาดำ Lipton ชนิดซอง (UNILEVER , อินโดนีเซีย)
- น้ำตาลทรายแดง (น้ำตาลวังขนาย, ไทย)
- ยีสต์ทางการค้า *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ Lalvin รหัส EC-1118 (Lalvin, แคนนาดา)

3.1.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

- หม้อ Stainless steel ขนาด 24 cm.
- เตาแม่เหล็กไฟฟ้า (PHILIPS รุ่น HD4911, Netherland)
- เทอร์โมมิเตอร์ (Comcube, ไทย)
- เครื่องชั่ง (ทศนิยม 3 ตำแหน่ง) (SHIMADZU, ญี่ปุ่น)
- เครื่องวัดปริมาณแอลกอฮอล์ (Vinometer) (Alla, ฝรั่งเศส)
- จานเพาะเชื้อพลาสติก (Petri plate) (Hycon, ไทย)
- เครื่องวัดค่าปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำ (Refractometer) (Hunna, สหรัฐอเมริกา)
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) (Tomy, ญี่ปุ่น)
- เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) (Toledo, ไทย)
- หลอดไมโครทิวป์ (Eppendorf tube) (Axygen, สหรัฐอเมริกา)
- เครื่องนับจำนวนโคโลนี (Manual colony counter) (Digitech, จีน)
- ขวดหมัก (Laboratory bottle) ขนาด 5 L (Duran, เยอรมัน)

3.1.3 สารเคมี

- น้ำกลั่น (Distilled water)
- เปปโตน (Peptone) (Himedia, อินเดีย)
- MRS agar (Himedia, อินเดีย)
- MRS broth (Himedia, อินเดีย)
- Potato dextrose agar (PDA) (Himedia, อินเดีย)
- Acetobacter agar (Himedia, อินเดีย)

- Nutrient broth (NB) (Himedia, อินเดีย)
- Nutrient agar (NA) (Himedia, อินเดีย)
- Yeast malt broth (YM broth) (Himedia, อินเดีย)
- ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide, H_2O_2) (ศิริบัญชา, ไทย)
- กรดทาร์ทาริก (Tartaric acid, $C_4H_6O_6$) (Ajax Finechem, ออสเตรเลีย)
- กลีเซอรอล (Glycerol) 99.5% (KemAus, ออสเตรเลีย)

3.2 วิธีการดำเนินงาน

3.2.1 การคัดแยกจุลินทรีย์จากน้ำหมักสมุนไพรไทย

3.2.1.1 การเตรียมตัวอย่างน้ำหมักสมุนไพรไทย

เตรียมตัวอย่างจากน้ำหมักสมุนไพรไทยที่มี SCOBY อายุ 3 ปีและ 8 ปี โดยแบ่งเป็น 3 รูปแบบ ได้แก่ SCOBY, น้ำหมักผสม SCOBY และน้ำหมัก ดังนี้

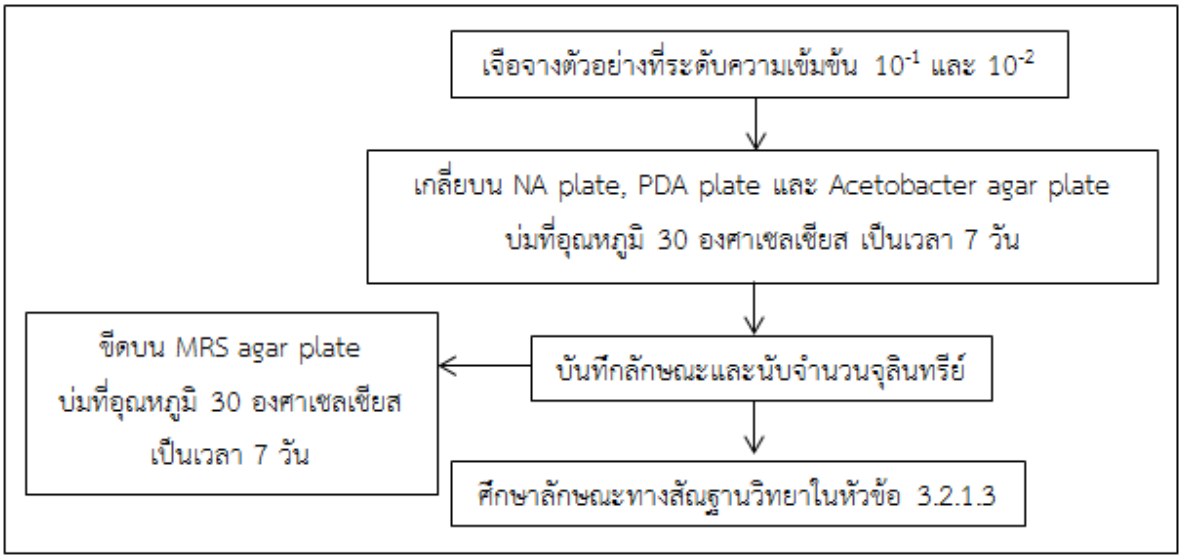
a) ตัวอย่างแบบ SCOBY เตรียมโดยสุ่มตัด SCOBY 3 แหล่งบน SCOBY ชิ้นเดียวกัน 1 กรัม

b) ตัวอย่างแบบน้ำหมักผสม SCOBY เตรียมโดยสุ่มตัด SCOBY 3 แหล่งบน SCOBY ชิ้นเดียวกัน 0.5 กรัม แล้วนำมาตีปั่นผสมกับน้ำหมัก 0.5 กรัม จากนั้นเก็บตัวอย่างในถุงร้อนหรือ Petri disk ปลอดเชื้อ

c) ตัวอย่างแบบน้ำหมัก 1 กรัม

3.2.1.2 การคัดแยกจุลินทรีย์จากตัวอย่าง

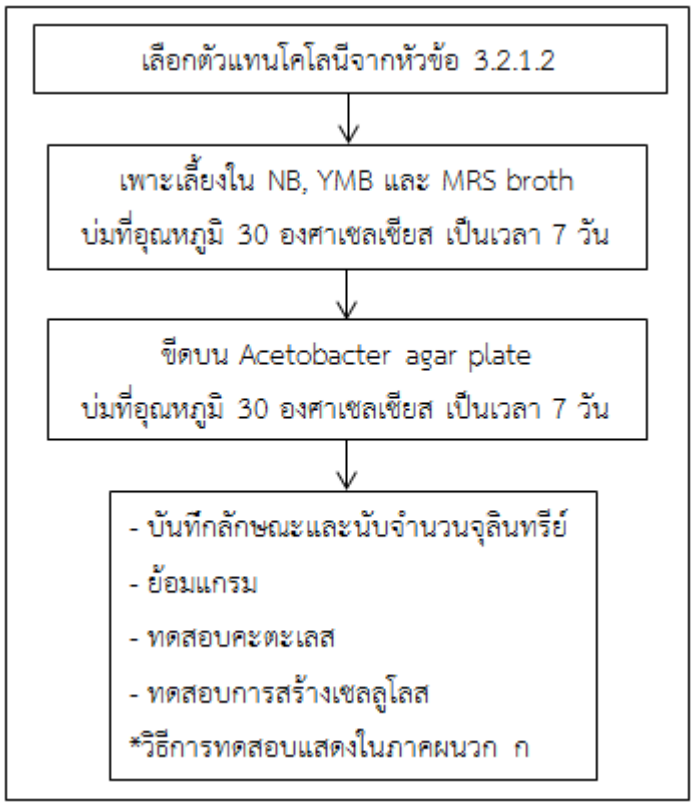
เจือจางตัวอย่างจากข้อ 3.2.1.1 ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-1} และ 10^{-2} ในสารละลาย Peptone 0.1% (w/v) และนำมาเกลี่ย (spread plate) บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ คือ Nutrient agar (NA), Potato dextrose agar (PDA) และ Acetobacter agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน บันทึกลักษณะและนับจำนวนจุลินทรีย์ เลือกตัวแทนโคโลนีไปศึกษาทางสัณฐานวิทยาดังรูปที่ 3.1 และ restreak บน MRS agar plate บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน



รูปที่ 3.1 การคัดแยกจุลินทรีย์จากตัวอย่าง

3.2.1.3 การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

เลือกตัวแทนโคโลนีจาก 3.2.1.2 เพาะเลี้ยงใน Nutrient broth (NB), Yeast malt broth (YMB) และ MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Chen *et al.*, 2011) เป็นเวลา 7 วัน นำไป streak บน Acetobacter agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน บันทึกลักษณะโคโลนี ย้อมแกรม ทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส และทดสอบการสร้างเซลลูโลส ดังรูปที่ 3.2 วิธีการทดสอบแสดงในภาคผนวก ก และเก็บไอโซเลตที่ได้ไว้ใน glycerol stock เพื่อนำไปประเมินสมบัติการหมักไอโซเลตที่คัดแยกได้ต่อไปในหัวข้อ 3.2.3

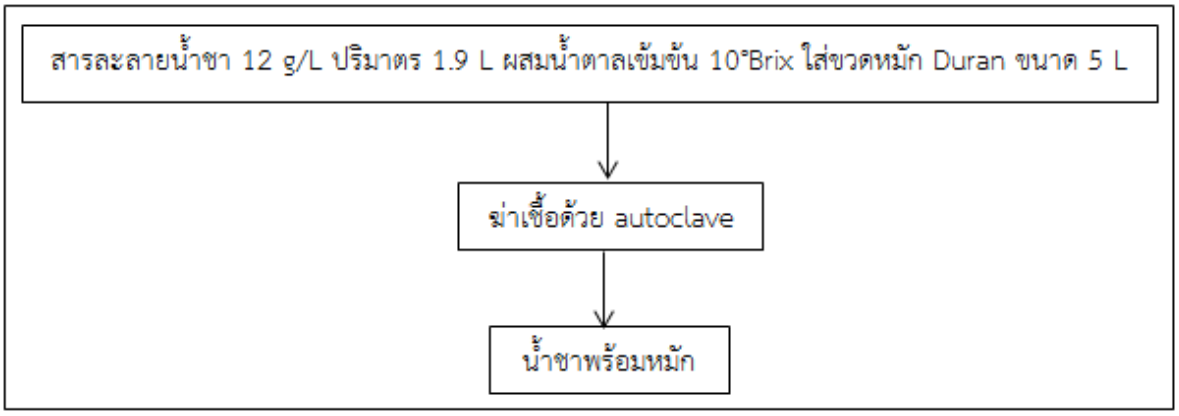


รูปที่ 3.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

3.2.2 ประเมินสภาวะการหมักน้ำชาแบบแอลกอฮอล์ด้วยยีสต์ทางการค้า

3.2.2.1 เตรียมน้ำชาพร้อมหมัก

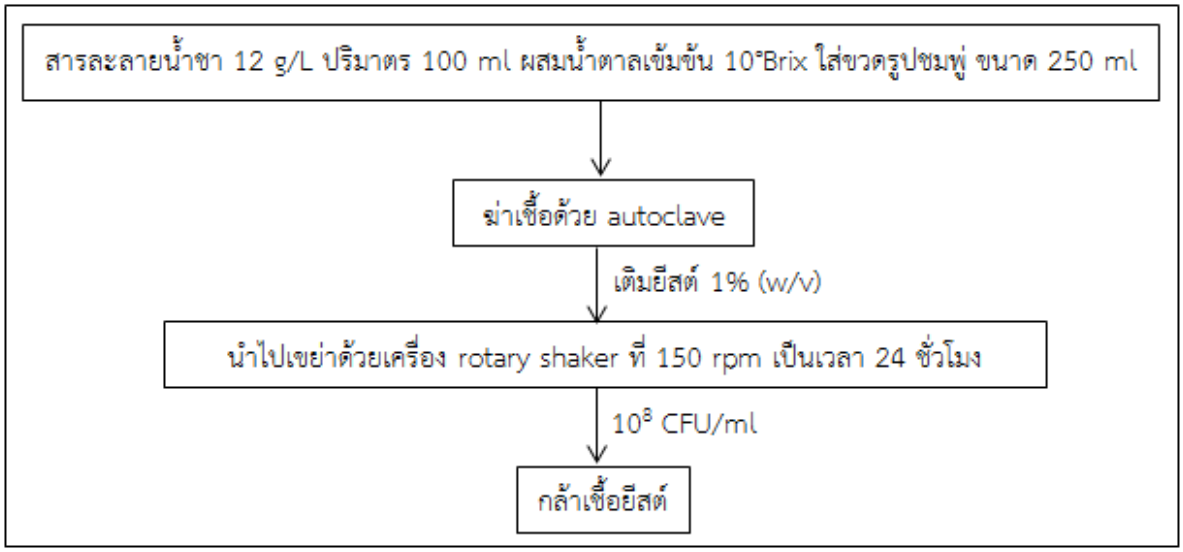
เติมสารละลายน้ำชา 12 g/L ปริมาตร 1.9 L ผสมน้ำตาลเข้มข้น 10 °Brix ใส่ขวดหมัก Duran ขนาด 5 L แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที ดังรูปที่ 3.3



รูปที่ 3.3 การเตรียมน้ำชาพร้อมหมัก

3.2.2.2 เตรียมกล้าเชื้อยีสต์ทางการค้า

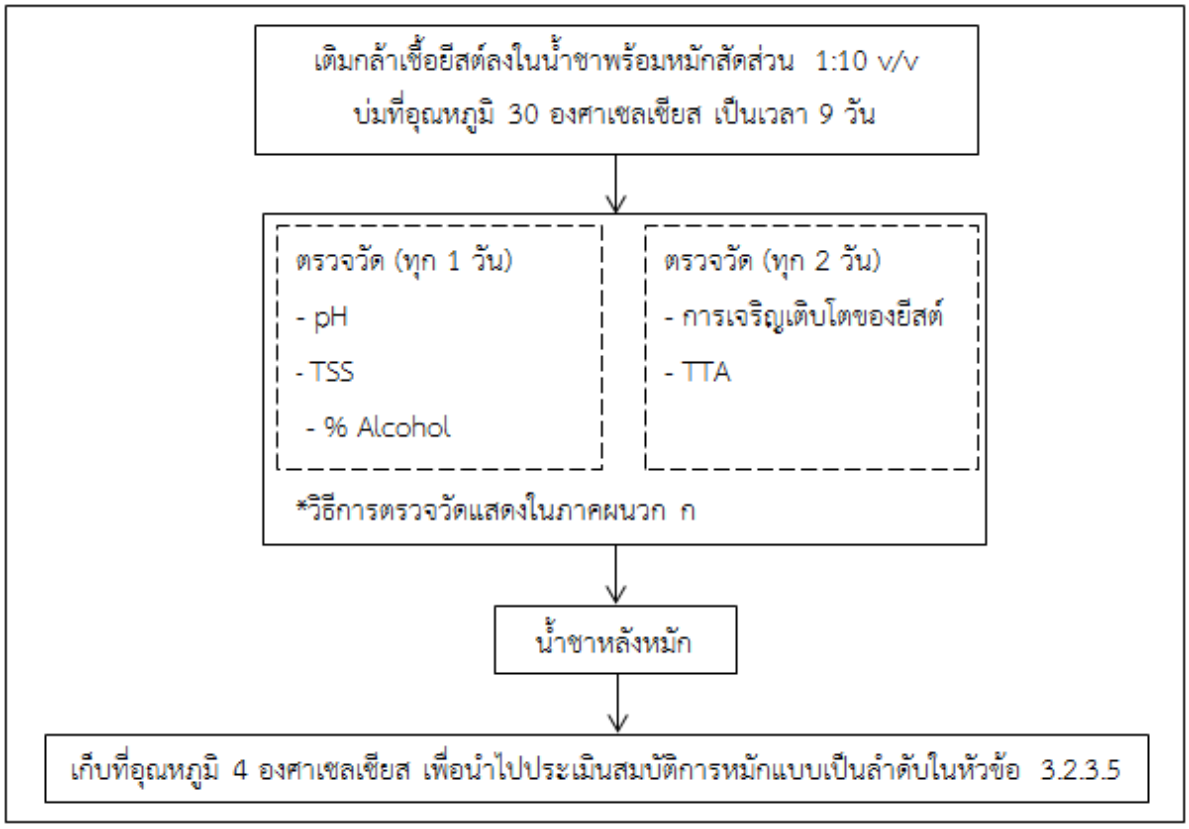
เติมสารละลายน้ำชา 12 g/L ปริมาตร 100 mL ผสมน้ำตาลเข้มข้น 10 °Brix ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วจึงเติมยีสต์ผง 1% (w/v) (*Saccharomyces cerevisiae* Lalvin EC-1118) ก่อนนำไปเขย่าด้วยเครื่อง rotary shaker ที่ความเร็วรอบ 150 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จนกระทั่งมีจำนวนยีสต์ที่มีชีวิตเป็น 10^{8} CFU/ml ตรวจนับโดยเจือจางที่ความเข้มข้น 10^{-8} แล้วแกลี่ยลงบน PDA plate บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดังรูปที่ 3.4



รูปที่ 3.4 การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์ทางการค้า

3.2.2.3 ประเมินสภาวะการหมักน้ำชาแบบแอลกอฮอล์ด้วยยีสต์ทางการค้า

เติมกล้าเชื้อยีสต์ลงในน้ำชาพร้อมหมักสัดส่วน 1:10 v/v แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน ในระหว่างการหมักจะตรวจวัดค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH) ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำ (Total soluble solids หรือ TSS) และปริมาณแอลกอฮอล์ (% Alcohol) ทุก 1 วัน และตรวจวัดการเจริญเติบโตของยีสต์และปริมาณกรดที่ไตเตรตได้ (Titratable acidity หรือ TA) ทุก 2 วัน วิธีการตรวจวัดแสดงในภาคผนวก ก จากนั้นนำน้ำชาหลังหมักเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปประเมินสมบัติการหมักไอโซเลตแบบเป็นลำดับต่อไปในหัวข้อ 3.2.3 ดังรูปที่ 3.5



รูปที่ 3.5 การประเมินสภาวะการหมักน้ำชาด้วยยีสต์ทางการค้า

3.2.3 ประเมินสมบัติการหมักคอมบูชาด้วยไอโซเลตที่คัดแยกได้

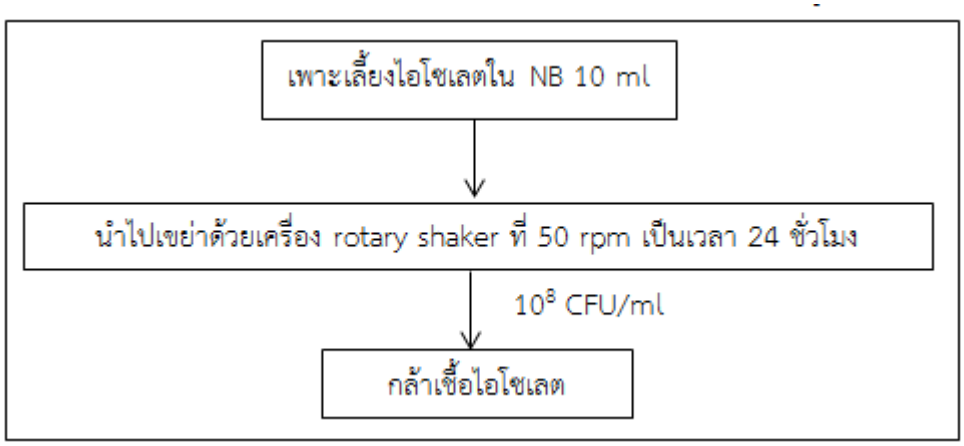
ประเมินสมบัติการหมักคอมบูชาด้วยไอโซเลตที่คัดแยกได้ ด้วยวิธีการหมัก 2 แบบ คือ การหมักแบบผสม (mixed culture fermentation) ด้วยยีสต์และไอโซเลตพร้อมกันในน้ำชาพร้อมหมัก และการหมักแบบลำดับ (sequential fermentation) โดยเติมไอโซเลต ในน้ำชาหลังหมักด้วยยีสต์ที่มีแอลกอฮอล์

3.2.3.1 เตรียมน้ำชาพร้อมหมัก

เตรียมด้วยวิธีเดียวกับ 3.2.2.1

3.2.3.2 การเตรียมกล้าเชื้อไอโซเลต

เพาะเลี้ยงไอโซเลตใน NB ปริมาตร 10 ml เขย่าด้วยเครื่อง rotary shaker ที่ความเร็วรอบ 50 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จนกระทั่งมีจำนวนไอโซเลตที่มีชีวิตเป็น 10^{8} CFU/ml ตรวจนับโดยเจือจางที่ความเข้มข้น 10^{-8} แล้วเกลี่ยลงบน PDA plate บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดังรูปที่ 3.6



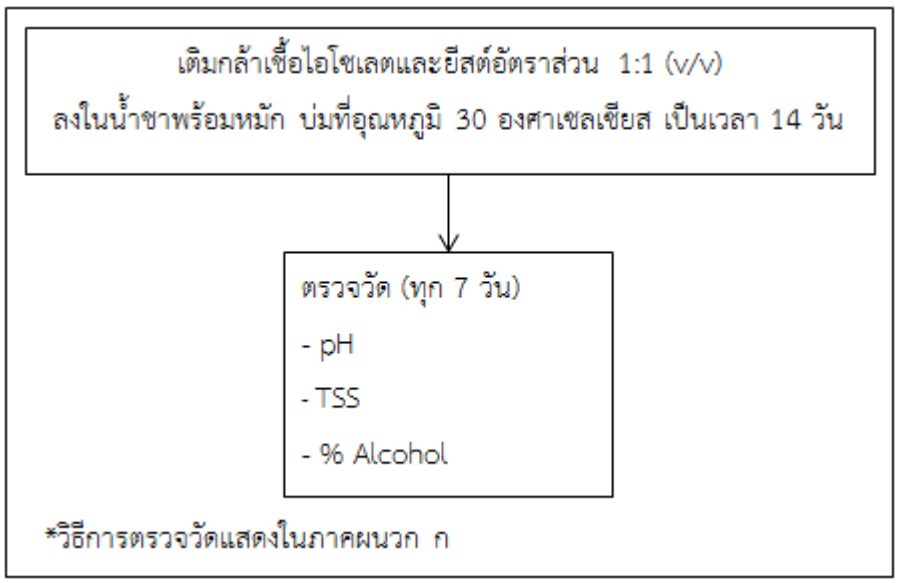
รูปที่ 3.6 การเตรียมกล้าเชื้อไอโซเลตสำหรับทดสอบสมบัติการหมักคอมบูชา

3.2.3.3 เตรียมกล้าเชื้อยีสต์ทางการค้า

เตรียมด้วยวิธีเดียวกับ 3.2.2.2

3.2.3.4 การหมักแบบผสม

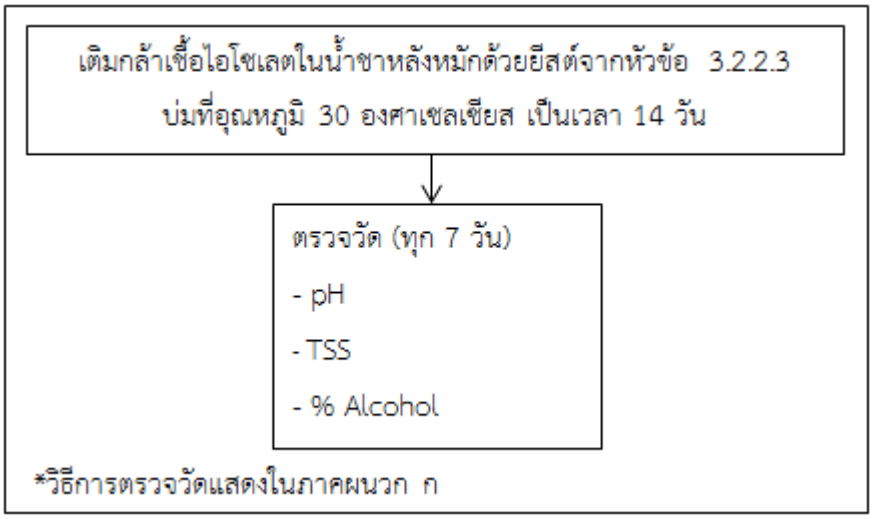
เติมกล้าเชื้อไอโซเลตและกล้าเชื้อยีสต์ทางการค้าจากหัวข้อ 3.2.3.2 และ 3.2.3.3 ตามลำดับอัตราส่วน 1:1 (v/v) ลงในน้ำชาพร้อมหมัก นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ในระหว่างการหมักตรวจวัดค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH) ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำ (Total soluble solids หรือ TSS) และปริมาณแอลกอฮอล์ (% Alcohol) ทุก 7 วัน วิธีการตรวจวัดแสดงในภาคผนวก ก ดังรูปที่ 3.7



รูปที่ 3.7 การหมักคอมบูชาแบบผสม

3.2.3.5 การหมักแบบเป็นลำดับ

เติมกล้าเชื้อไอโซเลตจาก 3.2.3.2 ลงในน้ำชาหลังหมักด้วยยีสต์จากข้อ 3.2.2.3 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ในระหว่างการหมักติดตามความเป็นกรด – ด่าง (pH) ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำ (Total soluble solid หรือ TSS) และปริมาณแอลกอฮอล์ (% Alcohol) ทุก 7 วัน ดังรูปที่ 3.8



รูปที่ 3.8 การหมักคอมบูชาแบบเป็นลำดับ

บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล

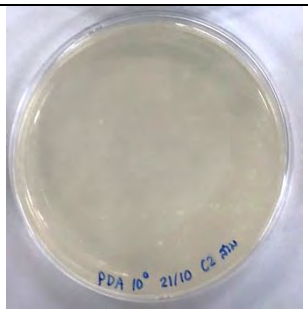
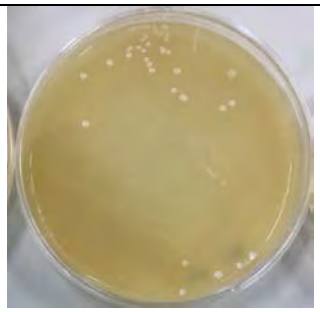
4.1 การคัดแยกจุลินทรีย์จากน้ำหมักสมุนไพรไทย

4.1.1 การคัดแยกจุลินทรีย์จากน้ำหมักสมุนไพรไทย

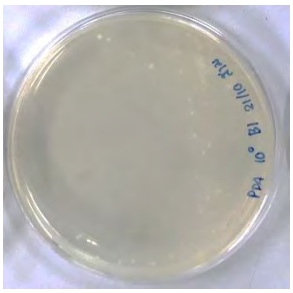
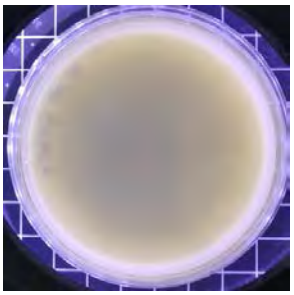
การศึกษานี้คัดแยกจุลินทรีย์จากน้ำหมักสมุนไพรไทยที่ประกอบไปด้วย มะขามป้อม ลูกยอและสมอไทย ที่มีอายุแตกต่างกันได้แก่ น้ำหมักสมุนไพรที่หมักเป็นเวลา 3 ปีและน้ำหมักสมุนไพรที่หมักเป็นเวลา 8 ปี คัดแยกด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 แบบ ได้แก่ Nutrient Agar (NA), Potato Dextrose Agar (PDA) และ Acetobacter agar โดยแยกจากตัวอย่างน้ำหมักสมุนไพร 3 ส่วน คือ SCOBY (Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast), น้ำหมักตีปั่นกับ SCOBY และน้ำหมักสมุนไพร

จากการทดลองนำ plate ที่ spread ตัวอย่างน้ำหมักสมุนไพรไปบ่มเป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากตารางที่ 4.1 และตารางที่ 4.2 พบว่า ไม่พบจุลินทรีย์ที่เจริญบน NA จึงไม่มีโคโลนีเพื่อนำไปตรวจสอบต่อ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีที่ได้จากน้ำหมักสมุนไพรซึ่งผ่านการหมักเป็นเวลา 3 ปี และ 8 ปี ซึ่งเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และ Acetobacter Agar นั้นมีลักษณะเดียว และมีลักษณะที่คล้ายคลึงกัน คือ มีรูปร่างกลมและนูนเล็กน้อย ผิวหน้าเรียบ ขอบเกลี้ยง สีครีมขุ่น และพบว่าโคโลนีที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ Acetobacter Agar มี clear zone เล็กน้อย บ่งชี้ว่าจุลินทรีย์ดังกล่าวมีการสร้างกรดย่อยแคลเซียมคาร์บอเนต และเมื่อนำมา restreak ใน MRS agar plate แล้วพบว่ามีลักษณะโคโลนีรูปร่างกลมและนูนเล็กน้อย ผิวหน้าเรียบ ขอบเกลี้ยง ทึบ สีครีมขุ่น เช่นเดียวกัน จากนั้นจึงเลือกตัวแทนโคโลนีไป streak ต่อในหัวข้อ 4.1.2 เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ตารางที่ 4.1 จำนวนจุลินทรีย์และลักษณะโคโลนีที่พบในตัวอย่างน้ำหมักสมุนไพรที่หมักเป็นเวลา 3 ปี ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด

อาหารเลี้ยงเชื้อ	น้ำหมักสมุนไพรที่หมักเป็นเวลา 3 ปี	จำนวนจุลินทรีย์ที่พบ (CFU/ml)	ลักษณะโคโลนีหลักที่พบ	ภาพ cell morphology	Gram strain
NA	SCOBY	ไม่พบ	-	-	-
	น้ำหมักสมุนไพรผสม SCOBY	ไม่พบ			
	น้ำหมักสมุนไพร	ไม่พบ			
PDA	SCOBY	3.1×10^2	โคโลนีมีรูปร่างกลมและนูนเล็กน้อย ผิวหน้าเรียบ ขอบเกลี้ยง ทึบ สีครีมขุ่น		ยีสต์/รา
	น้ำหมักสมุนไพรผสม SCOBY	2.7×10^2			
	น้ำหมักสมุนไพร	2.8×10^2			
Acetobacter agar	SCOBY	<25	โคโลนีมีรูปร่างกลมและนูนเล็กน้อย ผิวหน้าเรียบ ขอบเกลี้ยง ทึบ สีครีมขุ่นมี clear zone เล็กน้อย		Negative
	น้ำหมักสมุนไพรผสม SCOBY	<25			
	น้ำหมักสมุนไพร	<25			

ตารางที่ 4.2 จำนวนจุลินทรีย์และลักษณะโคโลนีที่พบในตัวอย่างน้ำหมักสมุนไพรที่หมักเป็นเวลา 8 ปี ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด

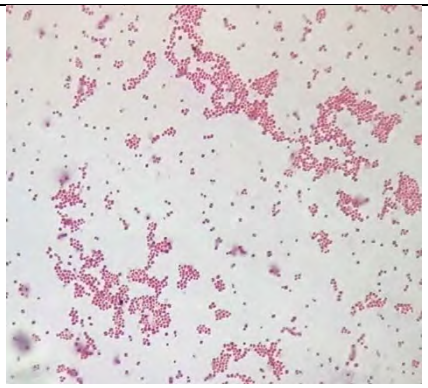
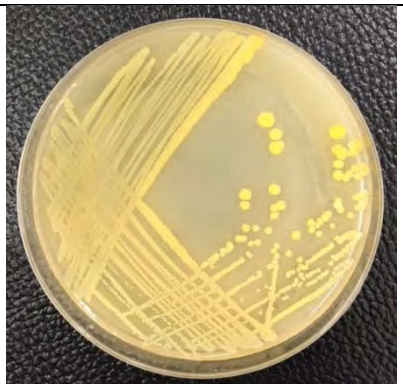
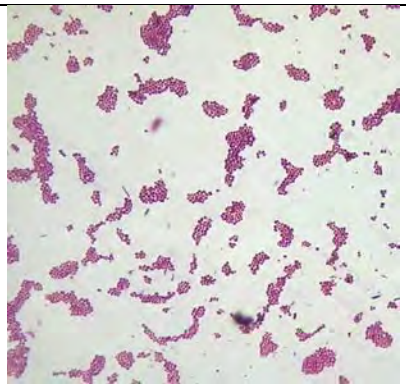
อาหารเลี้ยงเชื้อ	น้ำหมักสมุนไพรที่หมักเป็นเวลา 8 ปี	จำนวนจุลินทรีย์ที่พบ (CFU/ml)	ลักษณะโคโลนีหลักที่พบ	ภาพ cell morphology	Gram strain
NA	SCOBY	ไม่พบ	-	-	-
	น้ำหมักสมุนไพรผสม SCOBY	ไม่พบ			
	น้ำหมักสมุนไพร	ไม่พบ			
PDA	SCOBY	2.6×10^2	โคโลนีมีรูปร่างกลมและนูนเล็กน้อย ผิวหน้าเรียบ ขอบเกลี้ยง ทึบ สีครีมขุ่น		ยีสต์/รา
	น้ำหมักสมุนไพรผสม SCOBY	4.5×10^2			
	น้ำหมักสมุนไพร	2.9×10^2			
Acetobacter agar	SCOBY	<25	โคโลนีมีรูปร่างกลมและนูนเล็กน้อย ผิวหน้าเรียบ ขอบเกลี้ยง ทึบ สีครีมขุ่นมี clear zone เล็กน้อย		Negative
	น้ำหมักสมุนไพรผสม SCOBY	<25			
	น้ำหมักสมุนไพร	<25			

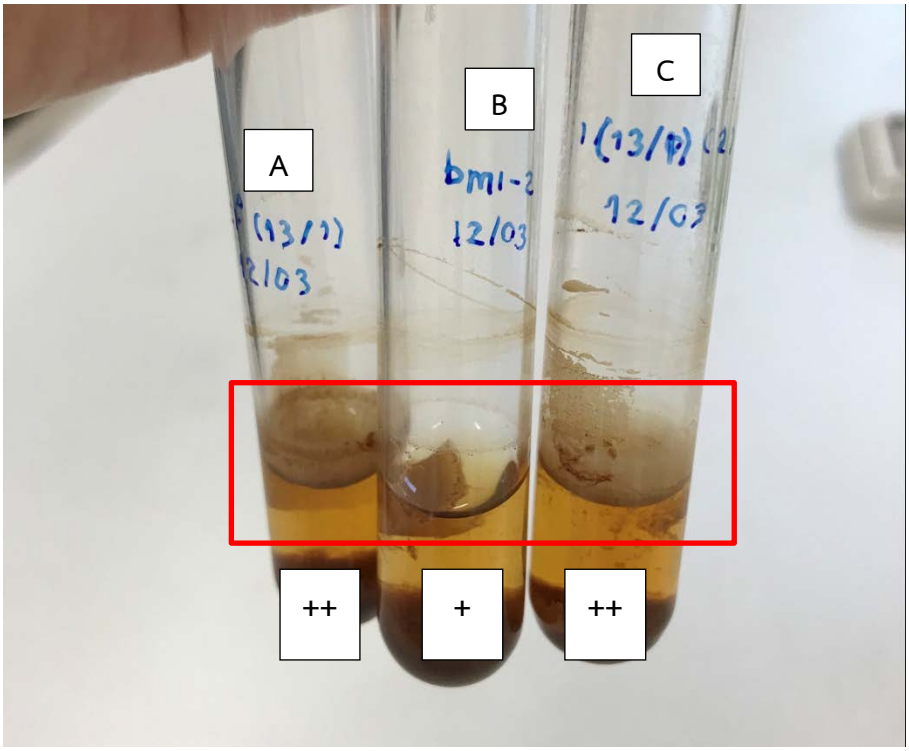
4.1.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการเพาะเลี้ยงตัวแทนโคโลนีที่เลือกจาก 4.1.1 ใน Nutrient broth (NB), Yeast Malt Broth (YMB) และ MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ก่อนนำไป streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Acetobacter agar และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน และถ่ายภาพลักษณะโคโลนี นำไปย้อมแกรม ทดสอบการสร้างคะตะเลส (catalase test) และทดสอบการผลิตเซลลูโลสในน้ำชา 1% (w/v) เติมน้ำตาลทรายเข้มข้น 1% (w/v) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 สัปดาห์

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า คัดแยกจุลินทรีย์ได้ 3 ไอโซเลต ดังตารางที่ 4.3 ไอโซเลต A และ C ที่คัดแยกได้ เจริญได้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์กลุ่มที่ผลิตกรดน้ำส้มสายชูในตระกูล Acetobacteraceae นอกจากนี้ยังพบการสร้างกรดทำปฏิกิริยากับแคลเซียมคาร์บอเนตเกิดเป็น clear zone ขึ้นเล็กน้อยบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ Acetobacter agar บ่งชี้ว่าจุลินทรีย์มีสมบัติในการสร้างกรด เมื่อนำไปทดสอบการสร้างคะตะเลส (catalase test) ผลเป็นบวก แสดงว่า สามารถผลิตเอนไซม์คะตะเลสได้ เมื่อนำไปย้อมแกรมพบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ovoid และจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ดังกล่าวสามารถสร้างเซลลูโลสได้ จากข้อมูลข้างต้นจึงสันนิษฐานว่า ไอโซเลต A และ C ที่คัดแยกได้อยู่ในตระกูล Acetobacteraceae (วันเชิญ และคณะ, 2550) และไอโซเลต B ที่คัดแยกได้ เมื่อนำไปย้อมแกรม พบว่า เป็นแบคทีเรียแกรมบวก short rod เมื่อนำไปทดสอบการสร้างคะตะเลส (catalase test) ผลเป็นลบ แสดงว่า ไม่สามารถผลิตเอนไซม์คะตะเลสได้ และสามารถสร้างเซลลูโลสได้แต่สร้างในปริมาณที่น้อยกว่าไอโซเลต A และ C จึงสันนิษฐานว่าไอโซเลต B ที่คัดแยกได้ไม่อยู่ในตระกูล Acetobacteraceae อย่างไรก็ตามเลือกจุลินทรีย์ไอโซเลต 3 ชนิดนี้ไปศึกษาสมบัติการหมักคอมบูชาในข้อ 4.3 จากผลการทดลองและการศึกษาไม่สามารถแยกยีสต์ได้

ตารางที่ 4.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และผลการทดสอบการสร้างคะตะเลส (catalase test) ของไอโซเลตที่คัดแยกได้

Isolate code	Catalase test	ลักษณะโคโลนีที่พบ	ภาพถ่ายแสดงลักษณะโคโลนี	ภาพถ่ายแสดงลักษณะเซลล์ภายหลังการย้อมแกรม
A	Positive	โคโลนีมีรูปร่างกลมและนูนเล็กน้อยผิวหน้าเรียบ ขอบเกลี้ยง ทึบ สีครีมขุ่น มี clear zone เล็กน้อย		
B	Negative	โคโลนีมีรูปร่างกลมและนูนเล็กน้อย ผิวหน้าเรียบด้าน ขอบเกลี้ยง ทึบ สีขาวขุ่น มี clear zone เล็กน้อย		
C	Positive	โคโลนีมีรูปร่างกลมและนูนเล็กน้อย ผิวหน้าเรียบ ขอบเกลี้ยง ทึบ สีเหลือง มี clear zone เล็กน้อย		



รูปที่ 4.1 การสร้างเซลลูโลสของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ในน้ำชา 1% (w/v) เติมน้ำตาลทรายเข้มข้น 1% (w/v) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 สัปดาห์

4.2 ประเมินสภาวะการหมักน้ำชาแบบแอลกอฮอล์ด้วยยีสต์ทางการค้า

เนื่องจากการหมักคอมบูชาประกอบด้วยการหมัก 2 รูปแบบ คือ การหมักแบบแอลกอฮอล์ คือ เกิดการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ระหว่างการหมัก และการหมักเพื่อสร้างกรด คือ เกิดการเปลี่ยนจากแอลกอฮอล์เป็นกรดระหว่างการหมัก การทดลองนี้จึงประเมินสภาวะการหมักน้ำชาแบบแอลกอฮอล์ด้วยยีสต์ทางการค้าเพื่อศึกษาสมบัติการหมักของยีสต์ก่อนนำไปหมักร่วมกับจุลินทรีย์ไอโซเลตที่คัดแยกได้แบบเป็นลำดับ (sequential fermentation) จากการประเมินสภาวะการหมักของน้ำชาหมักที่มีปริมาณชาเริ่มต้น 12 g/L และน้ำตาลเข้มข้นเริ่มต้น 10 °Brix แบบ Alcohol fermentation ด้วยยีสต์ทางการค้า *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ Lalvin รหัส EC-1118 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน โดยตรวจวัดค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH) ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำ (Total soluble solids หรือ TSS) และปริมาณแอลกอฮอล์ (% Alcohol) ทุก 1 วัน และตรวจวัดการเจริญเติบโตของยีสต์และปริมาณกรดที่ไตเตรตได้ (Titratable acidity หรือ TA) ทุก 2 วัน

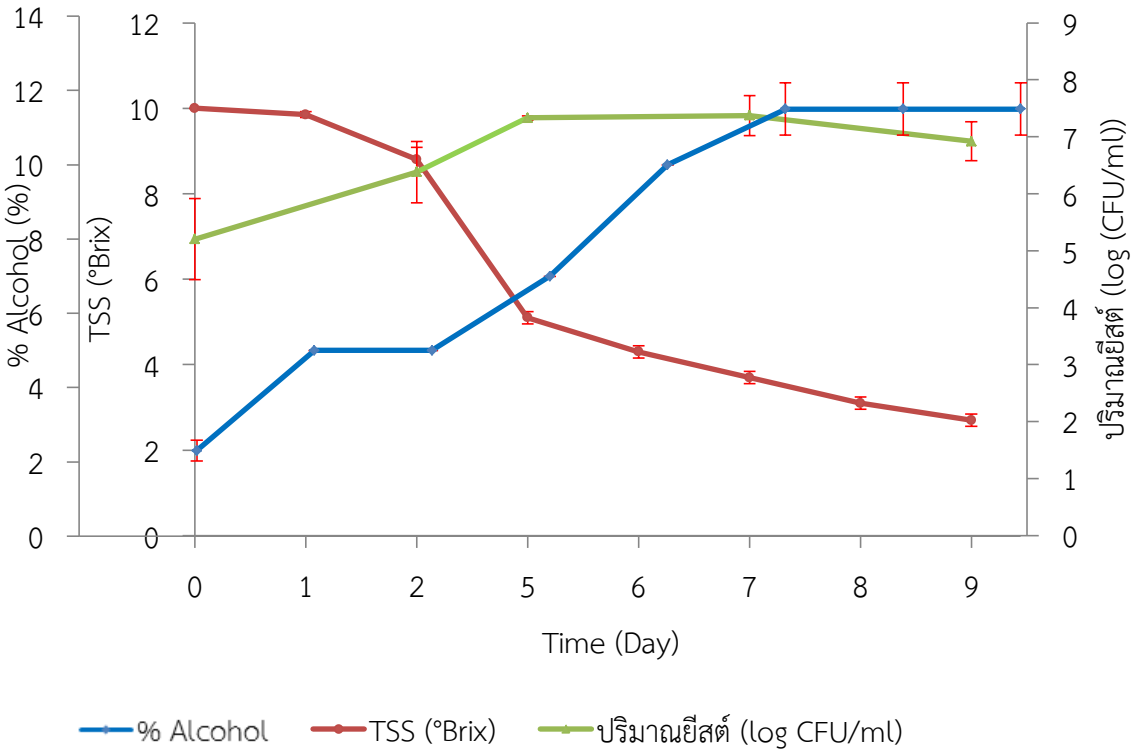
จากการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำ (Total soluble solids หรือ TSS) และปริมาณแอลกอฮอล์ (% Alcohol) ในระหว่างการหมักน้ำชาที่มีค่า TSS เริ่มต้น 10 °Brix ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.2 พบว่า ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ Lalvin รหัส EC-1118 เพิ่มจำนวนขึ้นในระหว่างการหมักวันที่ 0 ถึงวันที่ 5 ของการหมัก ในขณะที่ค่า TSS มีค่าลดลงสอดคล้องกับปริมาณแอลกอฮอล์ที่มีค่าเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ใช้น้ำตาลเป็นแหล่งพลังงานใน

การเจริญเติบโต ซึ่งในสภาวะปราศจากออกซิเจน ยีสต์จะเผาผลาญน้ำตาลด้วยกระบวนการ glycolysis และเกิดผลพลอยได้เป็นแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) และแอลกอฮอล์ (Bai *et al.*, 2008)

จากรูปที่ 4.2 แสดงให้เห็นว่า ในระหว่างวันที่ 0 ถึงวันที่ 5 ของการหมักปริมาณแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เนื่องจากมีปริมาณน้ำตาลอยู่มาก บ่งชี้ค่าของแข็งที่ละลายอยู่ในสารละลายมาก จึงทำให้ยีสต์นำน้ำตาลเข้าสู่เซลล์อย่างรวดเร็วเพื่อรักษาค่าแรงดันออสโมติกภายในเซลล์ให้มีค่าเท่ากับภายนอกเซลล์ (Honhmann *et al.*, 2002) อีกทั้งยังมีปริมาณยีสต์ยังไม่หนาแน่นไม่เกิดภาวะการอยู่ร่วมกันแบบแข่งขัน ทำให้ยีสต์สามารถเติบโตและสร้างแอลกอฮอล์ได้อย่างอิสระ เมื่อเข้าสู่วันที่ 7 ปริมาณแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้นเล็กน้อย เนื่องจากแอลกอฮอล์ที่เพิ่มขึ้นเป็นพิษกับเซลล์ประกอบกับปริมาณน้ำตาลที่เหลือในน้ำชาหมักลดลง ส่งผลให้ค่าแรงดันออสโมติกระหว่างภายในเซลล์และภายนอกเซลล์แตกต่างกันน้อยลง ยีสต์นำน้ำตาลเข้าสู่เซลล์น้อยลงปริมาณแอลกอฮอล์จึงเพิ่มขึ้นน้อยมาก และจำนวนยีสต์ที่มีชีวิตลดลงในวันที่ 9 เนื่องจากแอลกอฮอล์ที่เพิ่มขึ้นสะสมส่งผลให้เกิดสภาวะไม่เหมาะสมแก่การเจริญเติบโตของยีสต์ทำให้มียีสต์บางส่วนเริ่มตายลง หลังหมักน้ำชาด้วยยีสต์มีแอลกอฮอล์ 12% จากทฤษฎี การผลิตเอทานอลจากกลูโคส 1 g ให้เอทานอล 0.511 g และคาร์บอนไดออกไซด์ 0.498 g เนื่องจากยีสต์ใช้น้ำตาลประมาณ 6-12% เพื่อการเจริญเติบโต และบางส่วนถูกเปลี่ยนไปเป็นสารประกอบอื่นๆ เช่น กลีเซอรอล ซัคซิเนท และฟูเซลออยล์ (นฤมล โตอ่อน, 2549) ทำให้ปริมาณแอลกอฮอล์ที่ได้ต่ำกว่าปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเสมอ ซึ่งจากผลการทดลองข้างต้นปริมาณแอลกออล์ที่วัดได้มีค่าแตกต่างจากทฤษฎี เนื่องจากความผิดพลาดจากเครื่องมือเพราะ vinometer ที่ใช้วัดปริมาณแอลกอฮอล์เป็นอุปกรณ์ที่อาศัยหลักการของความถ่วงจำเพาะของสารละลาย ซึ่งปริมาณแอลกอฮอล์ที่วัดได้ขึ้นอยู่กับของแข็งที่ละลายอยู่ในสารละลาย เช่น กรดที่ไตเตรตได้ดังตารางที่ 4.5 จึงทำให้ปริมาณแอลกอฮอล์ที่วัดได้คลาดเคลื่อนจากทฤษฎี (ชัญญา วงค์จันทร์ และเนตรนภิศ น้อยทิม, 2555)

ตารางที่ 4.4 การเปลี่ยนแปลงของการเจริญเติบโตของยีสต์ ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำ (Total soluble solids หรือ TSS) ปริมาณแอลกอฮอล์ (% Alcohol) ในระหว่างการหมักน้ำชา ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน

Day	การเจริญเติบโตของยีสต์	ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำ (Total soluble solids หรือ TSS)	ปริมาณแอลกอฮอล์ (% Alcohol)
	ค่าเฉลี่ย (Log CFU/mL)	ค่าเฉลี่ย (°Brix)	ค่าเฉลี่ย (%)
0	5.20±0.71	10.00±0.00	2.3±0.3
1		9.85±0.07	5.0±0.0
2	6.38±0.54	8.80±0.28	5.0±0.0
5	7.33±0.04	5.10±0.14	7.0±0.0
6		4.30±0.14	10.0±0.0
7	7.37±0.35	3.70±0.14	11.5±0.7
8		3.10±0.14	11.5±0.7
9	6.92±0.34	2.70±0.14	11.5±0.7

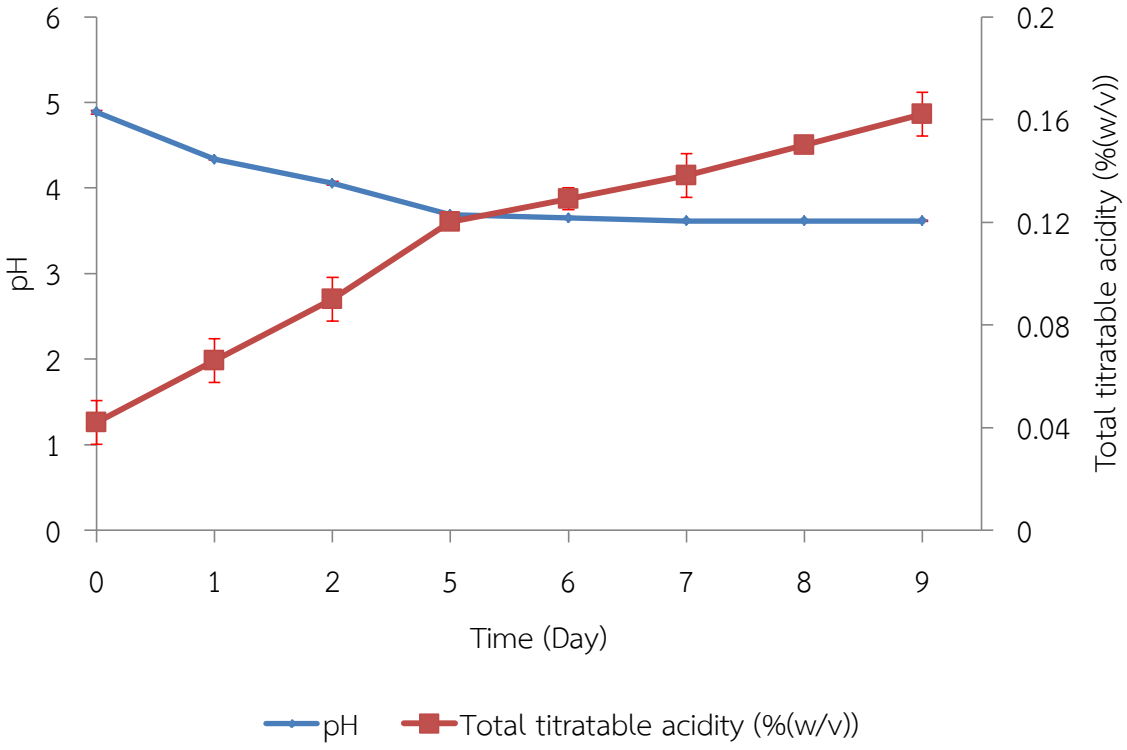


รูปที่ 4.2 การเปลี่ยนแปลงการเจริญของยีสต์ ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำ (Total soluble solids หรือ TSS) และปริมาณแอลกอฮอล์ (% Alcohol) ระหว่างการหมักน้ำชาโดยใช้ยีสต์ทางการค้า *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ Lalvin รหัส EC-1118 ที่มีค่า TSS เริ่มต้น 10 °Brix หมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน

จากการติดตามการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH) และปริมาณของกรดอินทรีย์ (Titratable acidity หรือ TA) ในระหว่างการหมักน้ำชา ที่มีค่า TSS เริ่มต้น 10 °Brix ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.5 พบว่า ค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH) เริ่มต้นที่ 4.885±0.021 และลดลงอย่างต่อเนื่องตั้งแต่วันที่ 1 ของการหมักจนถึงวันที่ 9 ของการหมัก เมื่อยุติการหมักมีค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH) เป็น 3.615±0.0071 สอดคล้องกับปริมาณของกรดที่ไตเตรตได้ (Titratable acidity หรือ TA) ที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากยีสต์มีการสร้างกรดระเหยง่าย (Volatile acidity) ส่วนมากจะเป็นกรดอะซิติก ในระหว่างการหมัก (Blomberg and Alder ,1992)

ตารางที่ 4.5 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณของกรดที่ไตเตรตได้ (Titratable acidity หรือ TA) และค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH) ในระหว่างการหมักน้ำชา ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน

Day	Titratable acidity	pH
	ค่าเฉลี่ย (%(w/v))	ค่าเฉลี่ย
0	0.042±0.008	4.885±0.021
1		4.335±0.007
2	0.090±0.008	4.055±0.021
5	0.120±0.000	3.690±0.00
6		3.650±0.014
7	0.138±0.008	3.615±0.007
8		3.615±0.007
9	0.162±0.008	3.615±0.007



รูปที่ 4.3 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณของกรดที่ไตเตรตได้ (Titratable acidity หรือ TA) และค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH) ในระหว่างการหมักน้ำชาโดยใช้ยีสต์ทางการค้า *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ Lalvin รหัส EC-1118 ที่มีค่า TSS เริ่มต้น 10°Brix หมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน

4.3 ประเมินสมบัติการหมักคอมบูชาด้วยไอโซเลตที่คัดแยกได้

การศึกษานี้นำไอโซเลตจากข้อ 4.1 ทั้ง 3 ไอโซเลต ได้แก่ A, B และ C ซึ่งไอโซเลต A และ C ที่คัดแยกได้มีสมบัติเป็นแบคทีเรียแกรมลบ สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสและสร้างเซลลูโลสได้ สันนิษฐานว่าไอโซเลต A และ C ที่คัดแยกได้อยู่ในตระกูล Acetobacteraceae และในส่วนของไอโซเลต B ที่คัดแยกได้เมื่อนำไปทดสอบการสร้างคะตะเลส (Catalase test) ไม่สามารถผลิตเอนไซม์คะตะเลสได้ จึงสันนิษฐานว่าไอโซเลต B ที่คัดแยกได้ไม่อยู่ในตระกูล Acetobacteraceae แต่สามารถสร้างเซลลูโลสได้ จึงนำไอโซเลตที่คัดแยกได้ทั้ง 3 ไอโซเลตดังกล่าวมาทดสอบคุณสมบัติการหมักด้วยวิธีการหมัก 2 แบบ ได้แก่ วิธีการหมักแบบผสม (Mixed cultured fermentation) คือ การหมักคอมบูชาโดยเริ่มต้นผสมหัวเชื้อที่เตรียมจากไอโซเลตกับยีสต์ทางการค้าในอัตราส่วน 1:1 (v/v) สารละลายน้ำชา 12 g/L ผสมน้ำตาลทราย 10% (w/v) ซึ่งมีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เริ่มต้นอยู่ในช่วง 4.85-4.95 ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำ (Total soluble solids หรือ TSS) เริ่มต้น 9.00°Brix และปริมาณแอลกอฮอล์ (% Alcohol) เริ่มต้น 0.0% และวิธีการหมักแบบเป็นลำดับ (sequential fermentation) คือ การหมักคอมบูชาโดยเริ่มต้นจากผสมหัวเชื้อที่เตรียมจากไอโซเลตลงในน้ำชาที่ผ่านการหมักแบบ Alcohol ด้วยยีสต์ทางการค้าจากการทดลองข้อ 4.2 ซึ่งมีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เริ่มต้นอยู่ในช่วง 4.27-4.46 ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำ (Total soluble solids หรือ TSS) เริ่มต้น 3.00°Brix และปริมาณแอลกอฮอล์ (% Alcohol) เริ่มต้น 12.0%

จากการประเมินสภาวะการหมักของไอโซเลตที่คัดแยกได้ระหว่างการหมักแบบผสม (Mixed culture fermentation) กับการหมักแบบเป็นลำดับ (Sequential fermentation) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน โดยติดตามการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH) ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำ (Total soluble solids หรือ TSS) และปริมาณแอลกอฮอล์ (% Alcohol) ดังตารางที่ 4.6

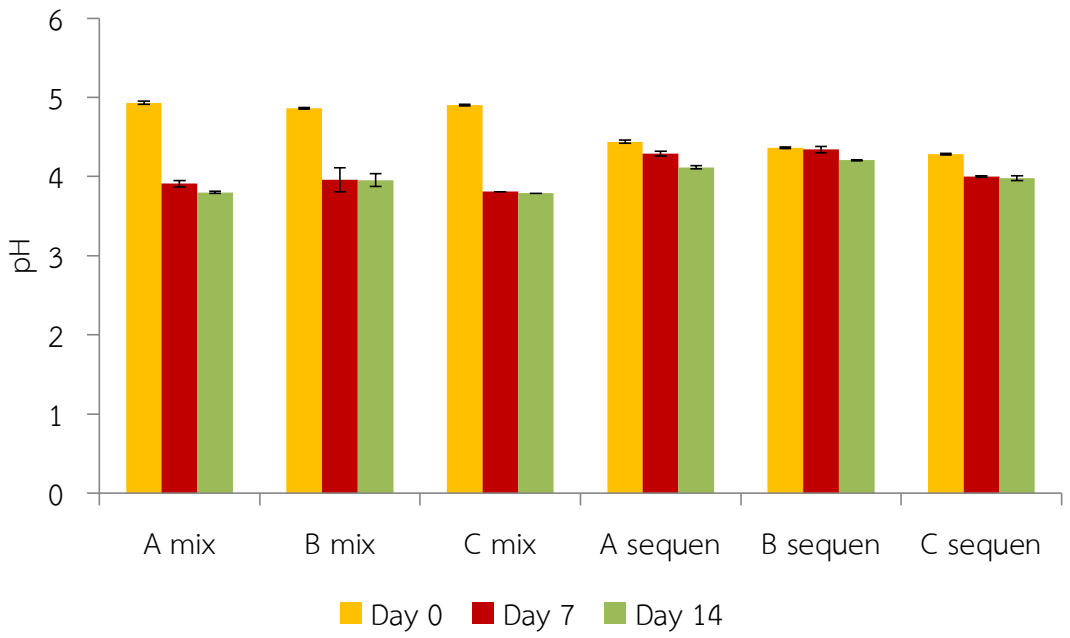
ในการหมักแบบผสม พบว่า น้ำชาหมักที่ได้จากการหมักแบบผสมด้วยไอโซเลต A และ C มีสมบัติคล้ายกัน คือ น้ำชาหลังหมักมีปริมาณแอลกอฮอล์ 9 % และมีค่า pH ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) จาก 4.9 เป็น 3.8 ส่วนการหมักด้วยไอโซเลต B พบว่า น้ำชาหลังหมักมีปริมาณแอลกอฮอล์ 12 % และมีค่า pH ไม่แตกต่างจากค่าเริ่มต้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ในการหมักแบบเป็นลำดับ พบว่า หลังหมักน้ำชาด้วยยีสต์ให้มีแอลกอฮอล์ 12% แล้วจึงเติมไอโซเลต A และ C น้ำชาหมักที่ได้มีแอลกอฮอล์ลดลงเหลือ 4.8 และ 2.8% ตามลำดับ และมีค่า pH ลดลงเหลือ 4.12 และ 3.98 ตามลำดับ ในขณะที่การหมักด้วยไอโซเลต B น้ำหมักมีปริมาณแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้นเป็น 14% และค่า pH ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) จากสมบัติการหมักบ่งชี้ว่า ไอโซเลต A และ C มีสมบัติการหมักแบบคอมบูชา กล่าวคือ สามารถหมักน้ำชาร่วมกับยีสต์แล้วเปลี่ยนแอลกอฮอล์ให้เป็นกรดได้จึงเป็นจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพที่จะนำไปพัฒนาเป็นกล้าเชื้อคอมบูชาได้ทั้งการหมักแบบผสมและการหมักแบบเป็นลำดับ (Jayabalan *et al.*, 2016)

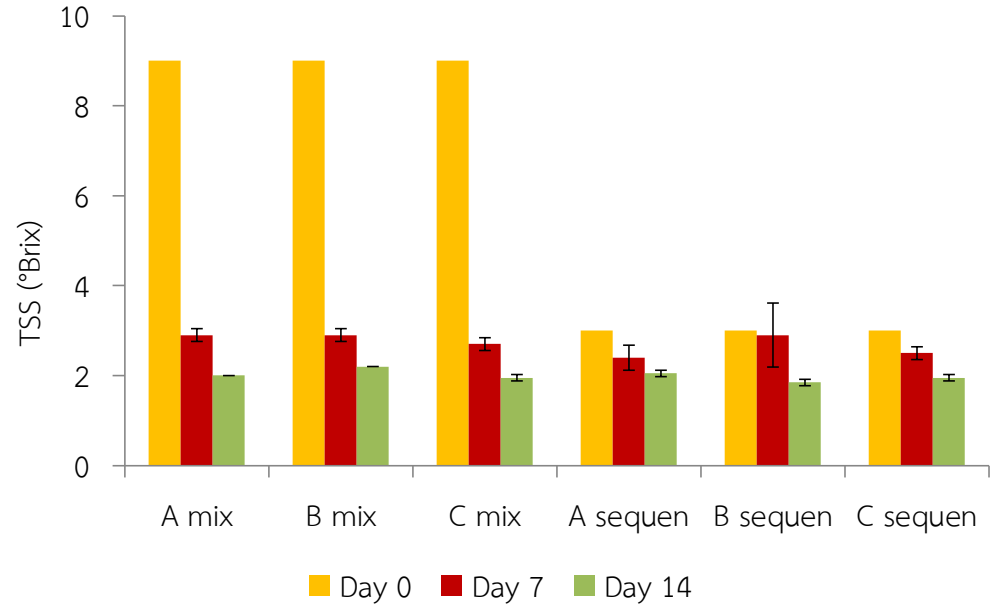
ตารางที่ 4.6 การเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH) ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำ (Total soluble solid หรือ TSS) และปริมาณแอลกอฮอล์ (% Alcohol) (%) ในระหว่างการหมักน้ำชาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน

Isolate code	ค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH)			ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำ (Total soluble solids หรือ TSS)			ปริมาณแอลกอฮอล์ (% Alcohol)		
	วันที่ 0	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 0	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 0	วันที่ 7	วันที่ 14
การหมักแบบผสม (Mixed culture fermentation)									
A	4.93^{a}±0.02	3.91^{b}±0.04	3.80^{c}±0.01	9.00^{a}±0.00	2.90^{b}±0.14	2.00^{c}±0.00	0.0^{b}±0.0	7.8^{a}±2.5	9.1^{a}±0.1
B	4.86^{a}±0.01	3.96^{b}±0.15	3.96^{b}±0.08	9.00^{a}±0.00	2.90^{b}±0.14	2.20^{c}±0.00	0.0^{b}±0.0	12.0^{a}±1.4	12.0^{a}±0.0
C	4.90^{a}±0.01	3.81^{b}±0.00	3.79^{c}±0.00	9.00^{a}±0.00	2.70^{b}±0.14	1.95^{c}±0.07	0.0^{b}±0.0	7.0^{a}±1.4	9.0^{a}±0.0
การหมักแบบเป็นลำดับ (Sequential fermentation)									
A	4.44^{a}±0.02	4.29^{a}±0.03	4.12^{b}±0.02	3.00^{a}±0.00	2.40^{b}±0.28	2.05^{b}±0.07	12.0^{b}±0.0	7.5^{a}±2.1	4.8^{a}±0.4
B	4.36^{a}±0.01	4.34^{a}±0.04	4.21^{b}±0.01	3.00^{a}±0.00	2.90^{b}±0.71	1.85^{b}±0.07	12.0^{b}±0.0	14.0^{a}±1.4	14.0^{a}±0.0
C	4.28^{a}±0.01	4.00^{b}±0.01	3.98^{b}±0.03	3.00^{a}±0.00	2.50^{b}±0.14	1.95^{c}±0.07	12.0^{c}±0.0	9.0^{b}±1.4	2.8^{a}±0.4

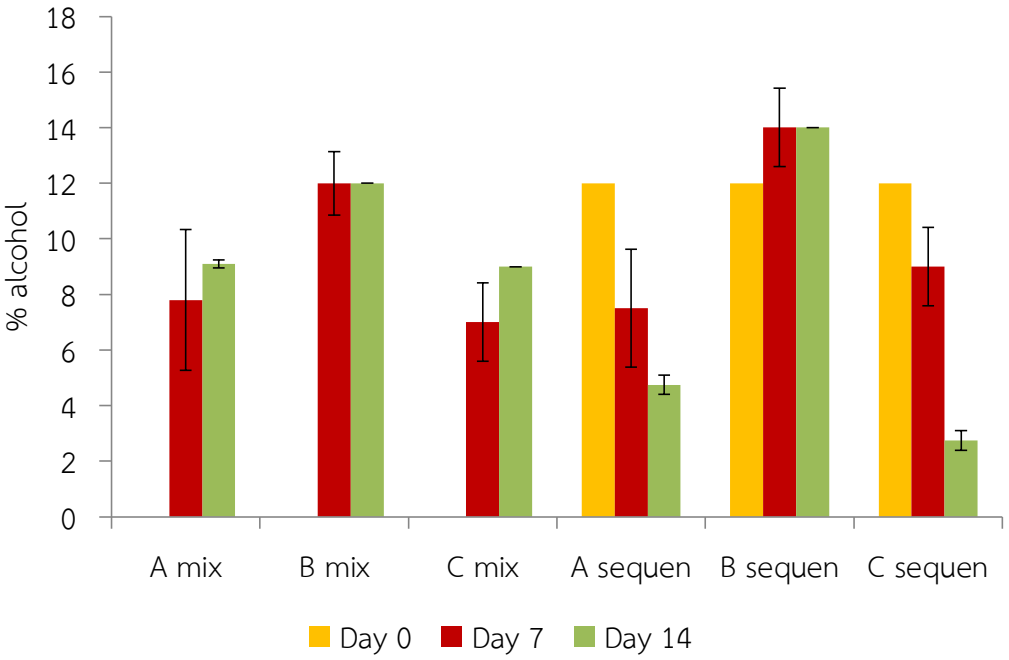
หมายเหตุ a, b, c หมายถึง ตัวเลขที่มีตัวอักษรกำกับมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)



รูปที่ 4.4 การเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH) ในระหว่างการหมักน้ำชาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน



รูปที่ 4.5 การเปลี่ยนแปลงปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำ (Total soluble solids หรือ TSS) ในระหว่างการหมักน้ำชา ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน



รูปที่ 4.6 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณแอลกอฮอล์ (% Alcohol) ในระหว่างการหมักน้ำชา ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย

5.1 การคัดแยกจุลินทรีย์จากน้ำหมักสมุนไพรไทย

จุลินทรีย์ที่พบไม่มีความหลากหลายและแยกเป็นตัวแทนได้ 3 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต A, B และ C โดยA และ C มีคุณลักษณะใกล้เคียงกัน คือ เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ovoid เป็น catalase positive สร้างเซลลูโลสและสร้าง clear zone บน Acetobacter agar ซึ่งทั้งหมดเป็นคุณลักษณะของแบคทีเรียในตระกูล Acetobacteraceae ในขณะที่ B เป็นแบคทีเรียแกรมบวก short rod เป็น catalase negative สร้างเซลลูโลสและสร้าง clear zone บน Acetobacter agar

5.2 ประเมินสภาวะการหมักน้ำชาแบบแอลกอฮอล์ด้วยยีสต์ทางการค้า

ประเมินการหมักน้ำชาแบบแอลกอฮอล์ด้วยยีสต์ทางการค้า พบว่า ยีสต์สามารถหมักน้ำชาผสมน้ำตาลทรายเข้มข้น 10°Brix ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส pH ประมาณ 4.9 เป็นเวลา 9 วัน สร้างแอลกอฮอล์ประมาณ 12% แตกต่างจากทฤษฎี ซึ่งปริมาณแอลกอฮอล์น้อยกว่าปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเสมอ คาดว่า ความผิดพลาดเกิดจากเครื่องมือเพราะ vinometer ที่ใช้วัดปริมาณแอลกอฮอล์เป็นอุปกรณ์ที่อาศัยหลักการของความถ่วงจำเพาะของสารละลาย ซึ่งปริมาณแอลกอฮอล์ที่วัดได้ขึ้นอยู่กับของแข็งที่ละลายอยู่ในสารละลาย เช่น กรดที่ไตเตรตได้ ทำให้ปริมาณแอลกอฮอล์ที่วัดได้คลาดเคลื่อนจากทฤษฎี

5.3 ประเมินสมบัติการหมักคอมบูชาด้วยไอโซเลตที่คัดแยกได้

ในการหมักแบบผสม พบว่า น้ำชาหมักที่ได้จากการหมักแบบผสมด้วยไอโซเลต A และ C มีสมบัติคล้ายกัน คือ น้ำชาหลังหมักมีปริมาณแอลกอฮอล์ 9 % และมีค่า pH ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% ส่วนการหมักด้วยไอโซเลต B พบว่า น้ำชาหลังหมักมีปริมาณแอลกอฮอล์ 12% และมีค่า pH ไม่แตกต่างจากค่าเริ่มต้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95%

ในการหมักแบบเป็นลำดับเมื่อเติมไอโซเลต B ปริมาณแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้นเป็น 14% และค่า pH ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ในขณะที่เมื่อเติมไอโซเลต A และ C ปริมาณแอลกอฮอล์ลดลงเป็น 4.8 และ 2.8% ตามลำดับ และ pH ลดลง บ่งชี้ สมบัติการหมักแบบคอมบูชา กล่าวคือ สามารถหมักน้ำชาร่วมกับยีสต์แล้วเปลี่ยนแอลกอฮอล์ให้เป็นกรดได้

ข้อเสนอแนะ

ไอโซเลต A และ C สามารถนำไปพัฒนาเป็นกล้าเชื้อหมักได้ทั้งแบบผสมและแบบเป็นลำดับ แต่ต้องศึกษาต่อเรื่องสมบัติการหมักคอมบูชาของแต่ละไอโซเลต แล้วจึงไปพัฒนากระบวนการหมักที่เหมาะสมเพื่อคุณสมบัติการหมักคอมบูชาที่ดีที่สุด

บรรณานุกรม

ชัญญา วงค์จันทร์ และ เนตรนภิศ น้อยทิม. การพัฒนากระบวนการหมักแอลกอฮอล์จากส่วนเหลือทิ้งของขนุนด้วยเครื่องกลั่นแอลกอฮอล์ขนาดกลาง. สาขาวิชาวิทยาการสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรธรรมชาติ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร, 2555.

ณพัฐอร บัวฉุน, ณัฐพล สิงสุข, พลวัฒน์ กันอาน และสุดารัตน์ แก้วประเสริฐ.ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบสมอไทย. วารสารวิจัยและพัฒนา วไลยอลงกรณ์ในพระบรมราชูปถัมภ์ 13 (พฤษภาคม–สิงหาคม 2561): 98-106.

นฤมล โตอ่อน. ยีสต์สายพันธุ์ทนร้อนและการประยุกต์ใช้ในการผลิตเอทานอล. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 2549.

ปิ่นมณี ขวัญเมือง. เครื่องดื่มโพรไบโอติกจากพืช : ทางเลือกเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ. วารสารครุสตร์อุตสาหกรรม 17 (มกราคม-เมษายน 2561): 212-220.

พันทิพา โพธิ์วัน. การผลิตเซลลูโลสโดย Acetobater xylinum ที่อุณหภูมิสูง. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวิภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2547.

ภัทชราวดี สโมสร. ผลปกป้องตับของสารสกัดมะขามป้อมในหนูขาวที่ได้รับเอทานอล. สาขาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2547.

วิชัย ราพฤทธิ์ และ ศรัณญา อำนักมณี. การศึกษาหาสูตรที่เหมาะสมในการผลิตสบู่ลูกยอ. สาขาวิชาเคมี คณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช, 2547.

สาคร ทองหล้า. ผลของการใช้สารสกัดจากลูกยอ เพื่อป้องกันการเกิดโรคเต้านมอักเสบในแม่โครระยะหยุดพักรีดนม. สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, 2555.

Bauer-petrovska, B., and Petrushevska-tozi, L. Mineral and water soluble vitamin contenting the Kombucha drink. International Journal of Food Science and Technology 35 (December 2001): 201–205.

Blanc, P.J. Characterization of the tea fungus metabolites. Biotechnology Letters 18 (February 1996): 139–142.

Blomberg, A., and Alder, L. Physiology of osmotolerance in fungi. Advanced in Microbiology and Physiology 33 (January 1992): 145–212.

Chakravorty, S., Bhattacharya, S., Chatzinotas, A., Chakraborty, W., Bhattacharya, D., and Gachhui, R. Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. International Journal of Food Microbiology 220 (March 2016): 63–72.

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

Coton, M., Pawtowski, A., Taminiau, B., Burgaud, G., Deniel, F., Coulloumme-Labarthe, L., and Coton, E. Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. FEMS Microbiology Ecology 93 (May 2017) : 1–16.

Guillamon, J., and Mas, A. Molecular Wine Microbiology, Acetic Acid Bactria, pp.228-250. Spain : Elsevier Inc, 2011.

Jayabalan, R., Malbaša, R.V., Lončar, E.S., Vitas, J.S., and Sathishkumar, M. A review on kombucha tea: Microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 13 (June 2014): 538-540.

Jayabalan, R., Malini,K., Sathishkumar,M., Swaminathan,K., and Yun, S.E.. Biochemical Characteristics of Tea Fungus Produced During Kombucha Fermentation. Food science and biotechnology 19 (June 2010): 1-5.

Jayabalan, R., Marimuthu, S., and Swaminathan, K. Changes in content of organic acids and tea polyphenols during Kombucha tea fermentation. Food Chemistry 102 (July 2007): 392–398.

Jayabalan, R., Malbaša, R.V., and Sathishkumar, M. Kombucha. Reference Module in Food Science 1 (November 2016): 5-8.

Jung, Y., Kim, I., Mannaa, M., Kim, J., Wang, S., Park, I., Kim, J., and Seo, Y. Effect of kombucha on gut-microbiota in mouse having non-alcoholic fatty liver disease. Food Science and Biotechnology 28 (July 2018): 261.

Kim, J., and Adhikari, K. Current Trends in Kombucha : Marketing Perspectives and the Need for Improved Sensory Research. Beverages 15 (March 2020): 1-19.

Kumar, S.D., Narayan, G., and Hassarajani, S. Determination of anionic mineral sin black and Kombucha tea using ion chromatography. Food Chemistry 111 (July 2008): 784–788.

Leal, J.M., Suárez, L.V., Jayabalan, R., Oros, J.H., and Aburto, A.E. A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites. CyTA - Journal of Food 16 (February 2018): 390-399.

Lopes, M.M.A., Sanches, A.G., Sousa, J.A., and Silv, E.O. Noni-Morinde citrifolia L., Exotic Fruits Reference Guide, pp. 319-325. Brazil : Embrapa Agroindústria Tropical., 2018.

Marsh, A.J., O'Sullivan, O., Hill, C., Ross, R.P., and Cotter, P.D. Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple Kombucha (tea fungus) samples. Food Microbiology 38 (September 2014): 171–178.

Miranda, B., Lawton, N.M., Tachibana, S.R., Swartz, N.A., and Hall, W.P. Titration and HPLC Characterization of Kombucha Fermentation: A Laboratory Experiment in Food Analysis. Journal of chemical education 93 (August 2016): 1770-1775.

Ohmori, S., Masai, H.,Arima, K., and Beppu, T. Isolation and Identification of Acetic Acid Bacteria for Submerged Acetic Acid Fermentation at High Temperature. Department of Agricultural Chemistry 44 (July 1980): 2901-2906.

Perricone, M., Gallo, M., Corbo, R.M., Sinigaglia, M., and Bevilacqua, A. The Microbiological Quality of Food. Yeasts, pp. 121-131. Italy: University of Foggia, 1972.

Prakash Chandra Gupta. Biological and pharmacological properties of Termialia chebula Retz. (Haritaki) - An overview. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 4 (January 2012): 62-68.

Roos, J.D., and Vuyst, L.D. Acetic acid bacteria in fermented foods and beverages. Current Opinion in Biotechnology 49 (February 2018): 115–119.

Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E., and Thompson, F. The Prokaryotes. New York: Springer, 2014.

Russell, I. YEAST LIFE SPAN, 77. Scotland: Edinburgh, 2016.

Saichana, N., Matsushita, K., Adachi, O., Frébort, I., and Frebortova, J.Acetic acid bacteria: A group of bacteria with versatile biotechnological applications. Biotechnology Advances 33 (November 2015): 1260-1271.

Skocinska, K.N., Sionek, B., Scibisz, I., and Krajewska,D.K. Acid contents and the effect of fermentation condition of Kombucha tea beverages on physicochemical, microbiological and sensory properties. CyTA - Journal of Food 15 (January 2017): 601-607.

Villarreal-Soto, S.A., Beaufort, S., Bouajila, J., Souchard, J., and Taillandier, P. Understanding kombucha tea fermentation: A review. Journal of Food Science 83 (December 2018): 580-588.

Walker, G.M., and Stewart, S.S. *Saccharomyces cerevisiae* in the Production of Fermented Beverages. Beverages 30 (November 2016): 1-12.

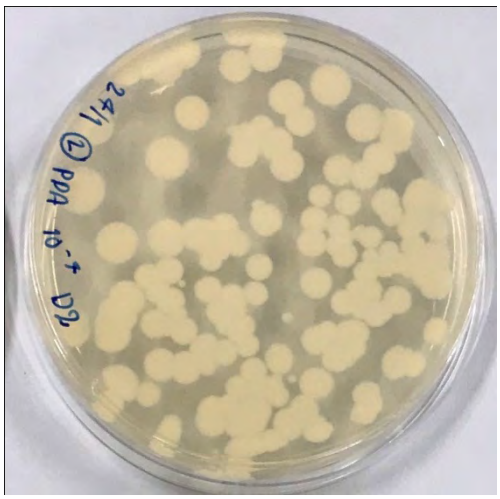
ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.

ขั้นตอนการทดลองและการตรวจสอบ

1. การตรวจสอบจำนวนจุลินทรีย์ยีสต์ที่มีชีวิตของน้ำชาหมักด้วยวิธีเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น PDA

1. เตรียมจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA
2. สุ่มตัวอย่างน้ำชาหมักในทุก 2 วันมาทำการเจือจางที่ 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6} และ 10^{-7} หรือเจือจางตามแนวโน้มของการเปลี่ยนแปลง
3. หยดน้ำชาหมักที่เจือจางแล้ว 0.1 ml ลงบนจานอาหารวุ้น PDA
4. เกลี่ยน้ำชาหมักให้ทั่วจานอาหารวุ้น PDA ด้วยแท่งแก้วรูปตัวแอลที่เผาไฟและรอให้เย็นแล้ว
5. นำจานอาหารวุ้น PDA จากข้อ 4. ไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
6. นับจุลินทรีย์โดยคิดว่า 1 โคโลนี คือ จุลินทรีย์ 1 ตัว ค่าที่ได้จะต้องอยู่ในช่วง 30-300 โคโลนี เพื่อลดค่าความผิดพลาดที่จะเกิดขึ้น



รูปที่ ผ.1 จานอาหารวุ้น PDA

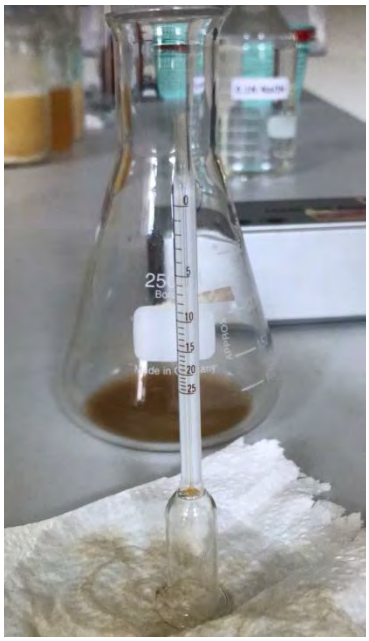
2. การวิเคราะห์ปริมาณกรดที่ไตเตรตได้ดัดแปลงจากวิธีของ AOAC (925.53,1925)

1. สุ่มน้ำชาหมักทุก 2 วัน ปิเปตน้ำชาหมัก 5.0 ml ใส่ในขวดลูกชมพู่ขนาด 250 ml
2. เติมน้ำกลั่น 20 ml ลงในขวดที่บรรจุน้ำชาหมัก ในข้อ 1.
3. หยด phenolphthaline 3 หยดผสมให้เป็นเนื้อเดียวกับน้ำชาหมัก
4. นำ ข้อ 3. ไปไทเทรตกับสารละลาย 0.1 N NaOH จนถึงจุดยุติ โดย phenolphthaline จะเป็นสีชมพู (pH = 8.30) สำหรับ blank จะใช้น้ำกลั่น 25 ml และดูค่าปริมาตร NaOH ที่ไทเทรตได้

$$\text{ปริมาณกรด (ร้อยละ)} = \frac{\boldsymbol{Normality\ x}\ \text{ปริมาตร}\ \boldsymbol{x}\ \text{น้ำหนักกรัมสมมูลของกรด}\ \boldsymbol{x\ 100}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}\ \boldsymbol{x\ 1000}}$$

3. การวัดปริมาณเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ (%) ในน้ำชาหมักด้วยเครื่อง Vinometer (ยี่ห้อ Alla france)

1. เตรียม Vinometer โดยทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่นและซับให้แห้ง
2. สุ่มน้ำชาหมักทุก 1 วัน ใส่น้ำชาหมักลงในช่องว่างด้านบน แต่ต้องระวังอย่าให้มีฟองปล่อยให้น้ำชาหมัก ปล่อยให้น้ำชาหมักไหลลงสู่ปลายของ Vinometer
3. เมื่อน้ำชาหมักไหลไปสู่ปลายของ Vinometer แล้วคว่ำเพื่ออ่านค่าแอลกอฮอล์ตามสเกล โดยค่าที่วัดมีหน่วยเป็น % (v/v)



รูปที่ ผ.2 การทดสอบด้วย Vinometer

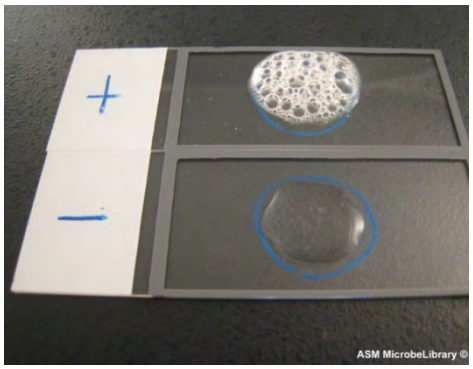
4. การหาปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดในน้ำชาหมัก โดยใช้ Hand Refract meter ตามวิธีของ AOAC (932.12,1990)

1. เตรียมเครื่อง Refractometer โดยนำน้ำสะอาดหยดที่ปริซึมของเครื่องและซับออกให้แห้ง
2. หยดน้ำกลั่นลงบนปริซึม 1-2 หยดและปิดฝาครอบ เพื่อให้น้ำกลั่นกระจายทั่วพื้นผิวของปริซึม ระวังอย่างให้มีฟองอากาศ จากนั้นมองผ่านเลนส์ได้ค่าเป็น 0 แล้วทำความสะอาดปริซึมอีกครั้ง
3. สุ่มน้ำชาหมักทุก 1 วัน หยดน้ำชาหมักลงบนปริซึม 1-2 หยด ปิดฝาครบ เพื่อให้น้ำชาหมักกระจายทั่วพื้นผิวของปริซึม ระวังอย่างให้มีฟองอากาศ เนื่องจะทำให้ค่าที่อ่านได้คลาดเคลื่อน
4. มองเลนส์ตาและอ่านค่าที่ระดับเส้นรอยต่อที่ตัดกับพื้นที่สีฟ้า โดยค่าที่อ่านได้มีหน่วยเป็น °Brix ซึ่งเทียบเท่ากับเปอร์เซ็นต์ของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (จำนวนกรัมของแข็งที่ละลายได้ ต่อ 100 กรัมของสารตัวอย่าง)
5. ใช้กระดาษซับน้ำชาหมักที่ติดอยู่กับปริซึมออกและทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่นและเช็ดให้แห้ง

5. การตรวจสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (Catalase test) จากวิธีของ Reiner, K.(2010)

การสร้างเอนไซม์คะตะเลสของแบคทีเรีย เนื่องจากแบคทีเรียใช้ออกซิเจนในกระบวนการหายใจระดับเซลล์ ตัวอะตอมของไฮโรเจนจะรวมตัวกับออกซิเจนจะรวมตัวกัน ทำให้เกิดไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ซึ่งเป็นอันตรายกับเซลล์ แบคทีเรียส่วนใหญ่จึงสามารถผลิตเอนไซม์คะตะเลส เพื่อย่อยสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้แตกออกได้ออกซิเจนกับน้ำ

1. เตรียมจานอาหารเลี้ยงเชื้อวุ้น Acetobacter ที่มีโคโลนีเจริญอยู่และสไลด์ที่สะสะอาด
2. ใช้ลูปที่เผาไฟเขี่ยโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อวุ้น Acetobacter
3. นำโคโลนีจาก ข้อ 2. วางลงบนสไลด์
4. หยดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ประมาณ 2-3 หยดลงบนเชื้อที่อยู่บนสไลด์
5. สังเกตผลได้ดังนี้ ผลบวกมีฟองอากาศเกิดขึ้นในทันทีและผลเป็นลบไม่มีฟองอากาศเกิดขึ้นที่แสดงตัวอย่างใน รูปที่ ผ.3



รูปที่ ผ.3 ผลของ Catalase test (Reiner, K.,2010)

ภาคผนวก ข.

ข้อมูลการทดลอง

1. ผลการทดสอบการหมักแบบผสมด้วยไอโซเลต

การคำนวณ Duncan : pH เมื่อหมักด้วยไอโซเลต A วันที่ 0, 7 และ 14

pH_A

Duncan[a]

mix	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Day 14	2	3.8000		
Day 7	2		3.9100	
day 0	2			4.9250
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

การคำนวณ Duncan : pH เมื่อหมักด้วยไอโซเลต B วันที่ 0, 7 และ 14

pH_B

Duncan[a]

mix	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Day 14	2	3.9550	
Day 7	2	3.9600	
day 0	2		4.8600
Sig.		.964	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

การคำนวณ Duncan : pH เมื่อหมักด้วยไอโซเลต C วันที่ 0, 7 และ 14

pH_C

Duncan[a]

mix	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Day 14	2	3.7900		
Day 7	2		3.8100	
day 0	2			4.8950
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

การคำนวณ Duncan : TSS (°Brix) เมื่อหมักด้วยไอโซเลต A วันที่ 0, 7 และ 14

Brix_A

Duncan[a]

mix	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Day 14	2	2.0000		
Day 7	2		2.9000	
day 0	2			9.0000
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

การคำนวณ Duncan : TSS (°Brix) เมื่อหมักด้วยไอโซเลต B วันที่ 0, 7 และ 14

Brix_B

Duncan[a]

mix	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Day 14	2	2.2000		
Day 7	2		2.9000	
day 0	2			9.0000
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

การคำนวณ Duncan : TSS (°Brix) เมื่อหมักด้วยไอโซเลต C วันที่ 0, 7 และ 14

Brix_C

Duncan[a]

mix	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Day 14	2	1.9500		
Day 7	2		2.7000	
day 0	2			9.0000
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

การคำนวณ Duncan : %Alcohol เมื่อหมักด้วยไอโซเลต A วันที่ 0, 7 และ 14

Alc_A

Duncan[a]

mix	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
day 0	2	.0000	
Day 7	2		7.8000
Day 14	2		9.1000
Sig.		1.000	.442

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

การคำนวณ Duncan : %Alcohol เมื่อหมักด้วยไอโซเลต B วันที่ 0, 7 และ 14

Alc_B

Duncan[a]

mix	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
day 0	2	.0000	
Day 7	2		12.0000
Day 14	2		12.0000
Sig.		1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

การคำนวณ Duncan : %Alcohol เมื่อหมักด้วยไอโซเลต C วันที่ 0, 7 และ 14

Alc_C

Duncan[a]

mix	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
day 0	2	.0000	
Day 7	2		7.0000
Day 14	2		9.0000
Sig.		1.000	.092

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

2. ผลการทดสอบการหมักแบบเป็นลำดับด้วยไอโซเลต

การคำนวณ Duncan : pH เมื่อหมักด้วยไอโซเลต A วันที่ 0, 7 และ 14

pH_A

Duncan[a]

sequential	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Day 14	2	4.1150	
Day 7	2		4.2900
day 0	2		4.3850
Sig.		1.000	.073

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

การคำนวณ Duncan : pH เมื่อหมักด้วยไอโซเลต B วันที่ 0, 7 และ 14

pH_B

Duncan[a]

sequential	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Day 14	2	4.2050	
Day 7	2		4.3350
day 0	2		4.4100
Sig.		1.000	.148

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

การคำนวณ Duncan : pH เมื่อหมักด้วยไอโซเลต C วันที่ 0, 7 และ 14

pH_C

Duncan[a]

sequential	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Day 14	2	3.9800	
Day 7	2	4.0000	
day 0	2		4.2750
Sig.		.363	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

การคำนวณ Duncan : TSS (°Brix) เมื่อหมักด้วยไอโซเลต A วันที่ 0, 7 และ 14

Brix_A

Duncan[a]

sequential	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Day 14	2	2.0500	
Day 7	2	2.4000	
day 0	2		9.0000
Sig.		.129	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

การคำนวณ Duncan : TSS (°Brix) เมื่อหมักด้วยไอโซเลต B วันที่ 0, 7 และ 14

Brix_B

Duncan[a]

sequential	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Day 14	2	1.8500	
Day 7	2	2.9000	
day 0	2		9.0000
Sig.		.083	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

การคำนวณ Duncan : TSS (°Brix) เมื่อหมักด้วยไอโซเลต C วันที่ 0, 7 และ 14

Brix_C

Duncan[a]

sequential	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Day 14	2	1.9500		
Day 7	2		2.5000	
day 0	2			9.0000
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

การคำนวณ Duncan : %Alcohol เมื่อหมักด้วยไอโซเลต A วันที่ 0, 7 และ 14

Alc_A

Duncan[a]

mix	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
day 0	2	.0000	
Day 7	2		7.8000
Day 14	2		9.1000
Sig.		1.000	.442

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

การคำนวณ Duncan : %Alcohol เมื่อหมักด้วยไอโซเลต B วันที่ 0, 7 และ 14

Alc_B

Duncan[a]

mix	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
day 0	2	.0000	
Day 7	2		12.0000
Day 14	2		12.0000
Sig.		1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

การคำนวณ Duncan : %Alcohol เมื่อหมักด้วยไอโซเลต C วันที่ 0, 7 และ 14

Alc_C

Duncan[a]

mix	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
day 0	2	.0000	
Day 7	2		7.0000
Day 14	2		9.0000
Sig.		1.000	.092

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	นางสาวชญาภรณ์ ตันติธรรม
ตำแหน่ง	หัวหน้าโครงการ
วุฒิการศึกษา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ.)
ภาควิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีที่สำเร็จการศึกษา	2562
โทรศัพท์	096-878-5512
Email	th.chayaporn@gmail.com

ชื่อ-สกุล	นางสาวลลิตา เลิศโกวิทย์
ตำแหน่ง	ผู้ร่วมวิจัย
วุฒิการศึกษา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ.)
ภาควิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีที่สำเร็จการศึกษา	2562
โทรศัพท์	082-795-3962
Email	lalita.lerko@gmail.com