ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของคอมบูชาในกระบวนการหมัก
Antibacterial and Antioxidant of Kombucha Fermentation Process

จุฑามาศ พรสันเทียะ[1], ทิพย์วรินทร์ ริมลำดวน[2], กุณฑิกา เวชกลาง[3],
นิสา ร่มส้มซ่า[4]*,

บทคัดย่อ

คอมบูชาจัดเป็นเครื่องดื่มที่ได้จากกระบวนการหมักชาดำหรือชาเขียว โดยใช้กล้าเชื้อในการหมักที่ประกอบด้วยแบคทีเรียและยีสต์ เรียกว่า SCOBY ซึ่งเป็นการหมักแบบใช้อากาศใช้ระยะเวลาในการหมัก 7 ถึง 14 วัน จุดประสงค์ของงานวิจัยครั้งนี้คือ ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของคอมบูชาจากชาดำที่ระยะเวลาการหมักเป็นเวลา 14 วัน โดยใช้เชื้อทดสอบดังนี้คือ *Bacillus subtilis, B. cereus, Salmonella sp., Stayphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* ด้วยวิธี Agar well diffusion พบว่า คอมบูชาวันเริ่มต้นของการหมัก มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *B. subtilis, B. cereus* โดยมีค่าดัชนีการยับยั้งแบคทีเรีย (Antibacterial index, AI) เท่ากับ 0.16±0.19และ 0.83±0.33 ตามลำดับ และไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *Salmonella sp., S. aureus* และ *E. coli* และเมื่อพิจารณาฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียของตัวอย่างคอมบูชาจากระยะเวลาการหมักในวันที่ 14 ของการหมักพบว่า คอมบูชามีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียเพิ่มมากขึ้นเมื่อใช้ระยะเวลาการหมักนานขึ้น โดยตัวอย่างคอมบูชาในวันที่ 14 ของการหมักมีฤทธิ์ยับยั้งได้มากที่สุด โดยมีค่าดัชนีการยับยั้งแบคทีเรียเท่ากับ 0.73±0.18, 1.30±0.24, 1.20±0.53 และ 1.91±0.28 ตามลำดับ จากวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่า ค่า % Scavenging activity ของตัวอย่างคอมบูชาเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมัก โดยค่า % Scavenging activity ของตัวอย่างเมื่อเริ่มต้นของการหมักเท่ากับ 52.9±2.35 เปอร์เซ็นต์ (เทียบกับ ascorbic acid 236.53 μg/ml) และตัวอย่างคอมบูชาจากการหมักในวันที่ 14 ของการหมักมีค่า % Scavenging activity เท่ากับ 57.60 เปอร์เซ็นต์ (เทียบกับ ascorbic acid 257.30 μg/ml) และจากวิธี ABTS ตัวอย่างคอมบูชาจากการหมักในวันที่ 14 ของการหมักมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 16.28 ±0.20 mM Trolox Equivalent Antioxidative Capacity นอกจากนี้ตัวอย่างคอมบูชามีปริมาณฟีนอลิกรวม เท่ากับ 0.99 ±0.44 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อมิลลิลิตร

คำสำคัญ : ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ คอมบูชา กระบวนการหมัก

[1]นักศึกษา สาขาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และศิลปศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน
[2]อาจารย์ สาขาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และศิลปศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน
[3]อาจารย์ สาขาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และศิลปศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน
*[4]อาจารย์ สาขาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และศิลปศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน; corresponding author: E-mail : nisa_romsomsa@hotmail.com

Abstract

Kombucha is a fermented tea beverage which is traditionally prepared by fermenting sweetened black or green tea (*Camellia sinensis* L.) with symbiotic consortium of bacteria and yeasts (SCOBY) and incubating under aerobic conditions for 7–14 days. Aim of this research is to evaluate antibacterial activity and antioxidant activity of kombucha which made from black tea in during fermentation process against *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *Salmonella* sp., *Stayphylococcus aureus* and *Escherichia coli* by agar well diffusion method. The result showed that the beginning of kombucha fermentation inhibited *B. subtilis* and *B. cereus* with showed antibacterial index, AI of 0.16±0.19 and 0.83±0.33, respectively. No antibacterial effect against *Salmonella sp., S. aureus* and *E. coli* were showed. According to the antibacterial activity of 14 days kombucha brewing, have shown an ability to inhibit the growth of bacteria and also has antimicrobial activity against a spectrum of organism. The maximum activity was founded at 14 days of kombucha fermentation organism against all isolates, the AI value was 0.73±0.18, 1.30±0.24, 1.20±0.53 and 1.91±0.28, respectively. The antioxidant activity was determined using the DPPH and ABTS methods. Kombucha samples exhibited increasing antioxidant activity during in the fermentation process by inhibiting 52.9±2.35 % of DPPH (equivalent to ascorbic acid of 236.53 μg/ml). The 14 days of kombucha sample showed highest antioxidant activity by inhibiting 57.60±0.65 % of DPPH (equivalent to ascorbic acid 257.30 μg/ml) and showed 16.28 ±0.20 mM Trolox Equivalent Antioxidative Capacity for ABTS assay. Remarkable high phenolic content was found in 14 days kombucha brewing 0.99±0.44 mg gallic acid equivalents per milliliter.

Keywords: Antibacterial, Antioxidant activity, Kombucha, Fermentation process

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ปัจจุบันสภาพสังคมมีความเปลี่ยนแปลงในลักษณะเป็นสังคมที่เร่งรีบในการทำงานและการดำเนินชีวิตประจำวัน รวมถึงสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปส่งผลให้ผู้คนนิยมหันมาดูแลสุขภาพกันมากขึ้นดังนั้นความต้องการผลิตภัณฑ์ที่ช่วยเสริมสร้างสุขภาพให้ร่างกายมีระบบภูมิคุ้มกันของผู้บริโภคจึงมีแนวโน้มมากขึ้นโดยปัจจุบันผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพได้ถูกพัฒนาขึ้นอย่างแพร่หลายในด้านวัตถุดิบจากธรรมชาติ กระบวนการผลิต รูปแบบและรสชาติของผลิตภัณฑ์ เพื่อตอบสนองความต้องการของผู้บริโภค นอกจากอาหารเพื่อสุขภาพแล้วความต้องการผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มเพื่อสุขภาพมีแนวโน้มสูงขึ้น โดยมูลค่าการบริโภคอาหารและเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพในปี 2562 จะมีมูลค่าประมาณ 88,731 ล้านบาท หรือมีอัตราการขยายตัว 2.4% เมื่อเทียบจากปี 2561 (ศูนย์วิจัยกสิกรไทย, 2562) ซึ่งผู้บริโภคหันมาให้ความสนใจรับประทานเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพจากธรรมชาติมากขึ้นโดยเฉพาะเครื่องดื่มที่มีสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) การต้านเชื้อจุลินทรีย์ ต้านการอักเสบ รวมไปถึงเป็นสารต้านการก่อมะเร็ง (โอภา, 2537)

คอมบูชา (Kombucha) หรือชาหมัก คือเครื่องดื่มที่นำเอาใบชาดำ ชาเขียว หรือใบชาอื่นๆมาหมักกับน้ำตาลและหัวเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast หรือเรียกว่า " SCOBY" ที่ก่อตัวเป็นเซลลูโลสที่มีลักษณะคล้ายเยลลี่อยู่ด้านบนเพื่อให้เกิดกระบวนการหมักชาอย่างน้อย 1 สัปดาห์ จนออกมาเป็นเครื่องดื่มที่มี รสชาติหวานอมเปรี้ยว มีกลิ่นแอลกอฮอล์เล็กน้อย เนื่องจากส่วนผสมหลักเป็นกรดน้ำส้ม (acetic acid) โดยประโยชน์ของเครื่องดื่มชาหมักช่วยส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันเนื่องจากมีสารต้านอนุมูลอิสระในปริมาณที่สูงมีจุลินทรีย์ที่เป็นโปรไบโอติกส์ (probiotics) คอมบูชามีกรดน้ำส้มหรือกรดอะซิติกเป็นส่วนประกอบหลักจึงมีคุณสมบัติช่วยกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นอันตรายต่อร่างกาย นอกจากนี้คุณสมบัติของคอมบูชายังช่วยลดความเสี่ยงโรคหัวใจและหลอดเลือด ลดความเสี่ยงโรคมะเร็ง ลดระดับน้ำตาลในเลือด เป็นต้น

ดังนั้น วัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้ เพื่อศึกษาฤทธิ์การต้านแบคทีเรียและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างคอมบูชาในระยะเวลาการหมักต่างๆกัน ภายใต้ช่วงกระบวนการหมักคอมบูชาเป็นเวลา 14 วัน

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์การต้านแบคทีเรียของตัวอย่างคอมบูชาในระยะเวลาการหมักต่างๆ ภายใต้ช่วงกระบวนการหมักคอมบูชาเป็นเวลา 14 วัน
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างคอมบูชาในระยะเวลาการหมักต่างๆ ภายใต้ช่วงกระบวนการหมักคอมบูชาเป็นเวลา 14 วัน

สมมติฐานการวิจัย

ทราบถึงคุณสมบัติของคอมบูชาโดยเปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ *B. subtilis, B. cereus, Salmonella* sp., *S. aureus* และ *E. coli* และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากการวิเคราะห์โดยวิธี DPPH และวิธี ABTS รวมถึงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในตัวอย่างคอมบูชาในช่วงระยะเวลาการหมัก

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมการหมักคอมบูชา

ขั้นตอนการหมักคอมบูชา นำชาดำ 3 ช้อนชา ชงกับน้ำที่ต้มเดือดปริมาณ 8 ลิตร เติมน้ำตาลทราย ¾ ถ้วย คนจนน้ำตาลละลาย จากนั้นทิ้งให้เย็นหรืออุ่นทำการแยกกากชาออกโดยการกรอง เทใส่โหล นำหัวเชื้อ Scoby ที่ได้จากการค้าใส่ลงในโหลปิดฝาโหลด้วยผ้าขาวบาง บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 14 วัน จากนั้นนำมากรองแล้วบรรจุใส่ภาชนะและแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

วิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย

วิเคราะห์ฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี agar well diffusionตามวิธีของMayo (1998) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton agar ซึ่งใช้เชื้อทดสอบ ได้แก่ *B. subtilis, B. cereus, S. aureus*, *E. coli* และ *Salmonella sp.* ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อทดสอบดังกล่าวในอาหาร LB broth บ่มที่อุณหภูมิ37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเตรียมสารละลายเซลล์ของเชื้อทดสอบมาปรับปริมาณโดยเทียบกับ Mc Farland No. 0.5 ซึ่งเท่ากับ 10^7CFU/ml นำเชื้อทดสอบแต่ละสายพันธุ์ที่เตรียมมาทำการ swab บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB จากนั้นเจาะหลุมวุ้น

ด้วย cork borer แล้วปิเปตตัวอย่างคอมบูชา100 μl ลงในหลุมอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา24 ชั่วโมงและคำนวณค่าดัชนี การยับยั้งแบคทีเรีย (Antibacterial index, AI) ดังนี้ (กิติพงศ์ อัศตรกุล และ นฤมล หมิะสุทธิเดช, 2560)

$$\text{Antibacterial index (AI)} = \frac{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณโซนใส} - \text{เส้นผ่านศูนย์กลางของหลุม}}{\text{เส้นผ่าศูนย์กลางของหลุม}}$$

วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2 diphenyl-picrylhydrazyl (DPPH)

เตรียมสารละลาย DPPH ที่ความเข้มข้น 40 mg/L เจือจางในเอทานอลให้มีค่าดูดกลืนแสงที่ 515nm เท่ากับ 0.9 เจือจางชาหมักในระดับความเจือจางที่เหมาะสม จากนั้นเติมลงในสารละลาย DPPH ที่มีปริมาตร 1.950 ml บ่มที่อุณหภูมิห้อง 30 นาทีในการทดลองชุดควบคุมใช้เอทานอล 50 µl แทนคอมบูชา เนื่องจากคอมบูชาที่ได้อาจมีสีจึงต้องนำตัวอย่างแต่ละระดับความเข้มข้นเติมลงเอทานอลที่มีปริมาตร 1.950 ml จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 nm เพื่อหักค่าสี การทดลองนี้ใช้ Ascorbic acid ที่ความเข้มข้น 0, 10, 20, 50, 80, 100, 120 mg/mlเป็นสารละลายมาตรฐาน คำนวณหา Scavenging activity (%) จากสมการ

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

วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline- 6-sulphonic acid) diammonium salt (ABTS)

เตรียมสารละลาย ABTS ผสมกับ สารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต (K_2SO_4) เข้มข้น 2.6 mM บ่มในที่มืดเป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นเจือจาง ABTS ในสารละลาย 10 Mm posphase buffer pH 7.4 ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงให้ได้ 0.700±0.02 ปิเปตคอมบูชา 20 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับสารละลายอนุมูลอิสระ ABTS ปริมาตร 1,980 ไมโครลิตร นำไป Vortex Mixer ทิ้งไว้ในที่มืด 5 นาที จากนั้นวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน Trolox ที่ความเข้มข้น 0,0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 Mm รายงานผลในหน่วยของ Trolox ต่อตัวอย่างคอมบูชา 1 มิลลิลิตร

วิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม

นำคอมบูชามาวิเคราะห์ และเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วนที่ต้องการ ปริมาตร 0.30 มิลลิลิตร ใส่ในขวดสีชา เติมสารละลาย10% Folin- Ciocalteu Reagent(โดยปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาตร 1.50 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 7.5% Na_2CO_3(โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ในน้ำกลั่น ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 10 มิลลิลิตร เขย่าให้สารละลายผสมกัน และตั้งไว้ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาทีเมื่อเกิดปฏิกิริยาสารละลาย จะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีน้ำเงิน แล้วนำไปวัดค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 765นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ โดยทดลอง3 ซ้ำ จากนั้นนำไปคำนวณหาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด จากกราฟมาตรฐานปริมาณกรดแกลลิก ในช่วง0.00 ถึง 0.30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สรุปผลการวิจัย

1. ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของคอมบูชาจากชาดำที่ระยะเวลาการหมักเป็นเวลา 14 วัน พบว่า ฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียของคอมบูชาเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมัก และเพิ่มขอบเขตการออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียได้มากขึ้น โดยสามารถยับยั้ง *B. subtilis, B. cereus, Salmonella sp., S. aureus* และ *E. coli* เมื่อระยะเวลาการหมักเป็นเวลา 7 ถึง 14 วัน

2. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของคอมบูชาด้วยวิธี DPPH พบว่า % Scavenging activity ของตัวอย่างเมื่อเริ่มต้นของการหมักเท่ากับ 52.9±2.35 เปอร์เซ็นต์ (เทียบกับ ascorbic acid 236.53 μg/ml) และตัวอย่างคอมบูชาจากการหมักในวันที่ 14 ของการหมักมีค่า % Scavenging activity เท่ากับ 57.60 เปอร์เซ็นต์ (เทียบกับ ascorbic acid 257.30 μg/ml) และจากวิธี ABTS ตัวอย่างคอมบูชาจากการหมักในวันที่ 14 ของการหมักมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 16.28 ±0.20 mM Trolox Equivalent Antioxidative Capacity นอกจากนี้ตัวอย่างคอมบูชามีปริมาณฟีนอลิกรวม เท่ากับ 0.99 ±0.44 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อมิลลิลิตร

อภิปรายผล

จากกระบวนการหมักคอมบูชาเป็นระยะเวลา 14 วัน พบว่า หัวเชื้อเริ่มต้นของคอมบูชามีการสร้างแผ่นเซลลูโลสขึ้นบนผิวหน้าของชาที่หมักมีความหนาเท่ากับ 1 เซนติเมตร (ภาพที่ 1) โดยแผ่นเซลล์โลสที่สร้างขึ้นใหม่จะมีสีขาวนวลสะสมบริเวณด้านบน แสดงดังภาพที่ 2 ทั้งนี้เนื่องจากยีสต์ในหัวเชื้อหมักคอมบูชาจะใช้น้ำตาล และสารอาหารในชาเกิดเป็นผลผลิตเป็นแอลกอฮอล์ และแบคทีเรียกรดอะซิติกจะเปลี่ยนแอลกอฮอล์ให้เป็นกรดอะซิติกและสร้างเซลลูโลสสะสมบริเวณด้านบนผิวหน้าของชา (Soto และคณะ, 2018)

ภาพที่ 1 คอมบูชาในระยะเวลาการหมัก 14 วัน

ภาพที่ 2 ลักษณะของแผ่นเซลลูโลสที่สร้างขึ้น

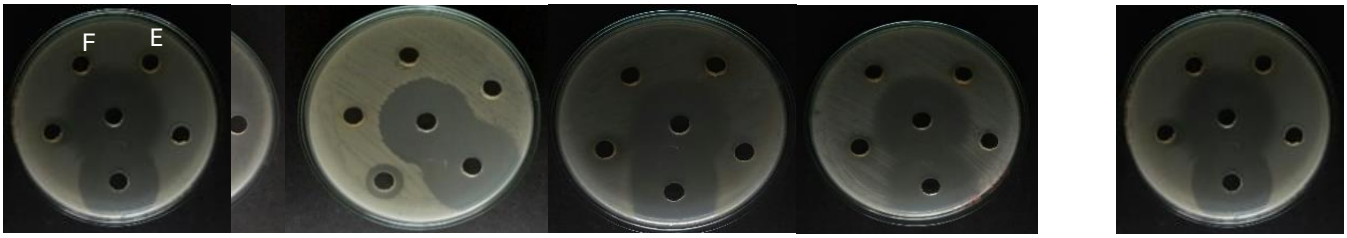
วิเคราะห์ฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียของคอมบูชา

จากผลการทดลองศึกษาฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียของคอมบูชาวันเริ่มต้นของการหมัก(วันที่0) โดยมีเชื้อทดสอบดังนี้คือ *B. subtilis, B. cereus, Salmonella sp., S. aureus* และ *E. coli* ด้วยวิธี Agar well diffusion พบว่า คอมบูชาวันเริ่มต้นของการหมัก มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *B. subtilis, B. cereus* โดยมีค่าดัชนีการยับยั้งแบคทีเรีย (Antibacterial index, AI) เท่ากับ 0.16±0.19และ 0.83±0.33 ตามลำดับ และไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *Salmonella sp., S. aureus* และ *E. coli* ได้ ทั้งนี้เนื่องจากในคอมบูชามีกรดอะซิติกที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียโดยการสะสมไอออนลบที่เยื่อหุ้มเซลล์ (E. Mani-López และคณะ 2012) อย่างไรก็ตามฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียของคอมบูชานอกจากกรดอินทรีย์แล้ว เพื่อเป็นการทดสอบในส่วนประกอบของคอมบูชาที่อาจมีเอนไซม์หรือโปรตีนที่มีสารออกฤทธิ์อื่นๆ อยู่หรือไม่ จากผลการทดลองพบว่าเมื่อปรับค่าพีเอชของตัวอย่างคอมบูชา และนำตัวอย่างคอมบูชามาผ่านความร้อนแล้ว ไม่พบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย แสดงถึงอาจมีเอนไซม์หรือโปรตีนที่มีสารออกฤทธิ์อื่นๆในคอมบูชา ที่มีคุณสมบัติที่ไม่ทนความร้อนและค่าพีเอชที่ไม่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์หรือโปรตีนดังกล่าว แสดงดังภาพที่ 3 และตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ค่าดัชนีการยับยั้งแบคทีเรีย (Antibacterial index, AI)

ระยะเวลาการหมักคอมบูชา (วัน)	ค่าดัชนีการยับยั้งแบคทีเรีย (Antibacterial index, AI)				
	B. subtilis	*B. cereus*	*Salmonella sp.*	*S. aureus*	*E. coli*
0	0.16±0.19	0.83±0.33	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง
7	0.48±0.07	1.27±0.09	1.22±0.16	1.15±0.22	0.91±0.33
14	0.73±0.18	1.30±0.24	1.20±0.53	1.91±0.28	ไม่ยับยั้ง

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยจากการทดลองซ้ำ 3 ซ้ำ



[พิมพ์คำอ้างอิงจากเอกสารหรือบทสรุปของจุดที่น่าสนใจ คุณสามารถจัดตำแหน่งกล่องข้อความได้ทุกที่ในเอกสาร ให้ใช้แท็บ 'เครื่องมือกล่องข้อความ' เพื่อเปลี่ยนแปลงการจัดรูปแบบของกล่องข้อความของคำอ้างอิงที่ดึงมา]

B. subtilis B *S. aureus* *E. coli*

ภาพที่ 3 ฤทธิ์การยับยั้ง วันที่0)

หมายเหตุ A) Positive co

B) Negative c

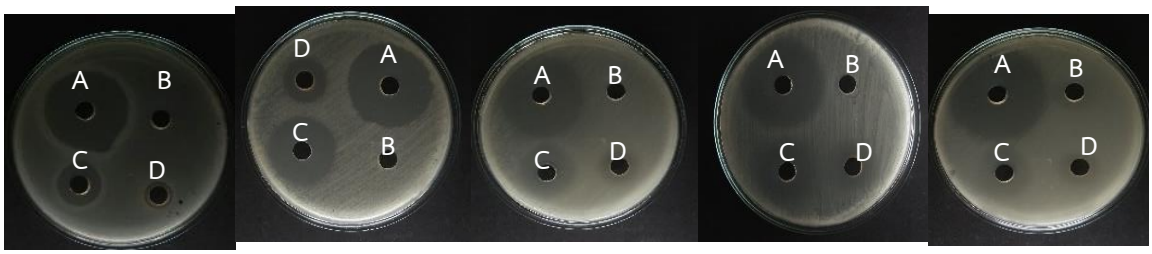
C) 1% Aceti

D) คอมบูชาวันเริ่มหมัก (วันที่ 0)

E) คอมบูชาวันเริ่มหมัก ปรับpH เท่ากับ 7

F) คอมบูชาวันเริ่มหมัก ปรับ pH7 ทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส 5 ชั่วโมง

เมื่อพิจารณาฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียของคอมบูชาที่หมักเป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่า คอมบูชามีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้ทั้ง 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *B. subtilis, B. cereus, Salmonella sp., S. aureus* และ *E. coli* โดยมีค่าดัชนีการยับยั้งแบคทีเรีย (AI) เท่ากับ 0.48±0.07, 1.27±0.09, 1.22±0.16, 1.15±0.22 และ 0.91±0.33 ตามลำดับ (ภาพที่ 4) ทั้งนี้เนื่องจากคอมบูชาที่ระยะเวลาการหมักเป็นเวลา 7 วัน มีปริมาณกรดอะซิติกที่ถูกผลิตเพิ่มมากขึ้น หรือมีการสร้างเอนไซม์หรือโปรตีนที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพเพิ่มมากขึ้น เช่นเดียวกับการศึกษาของที่คอมบูชาสามารถยับยั้ง *Salmonella sp.*และ *E. coli* ได้ (Velićanski และคณะ, 2014)



B. subtilis *B. cereus* *Salmonella sp.* *S. aureus* *E. coli*

ภาพที่ 4 ฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียของคอมบูชาที่หมักเป็นระยะเวลา 7 วัน

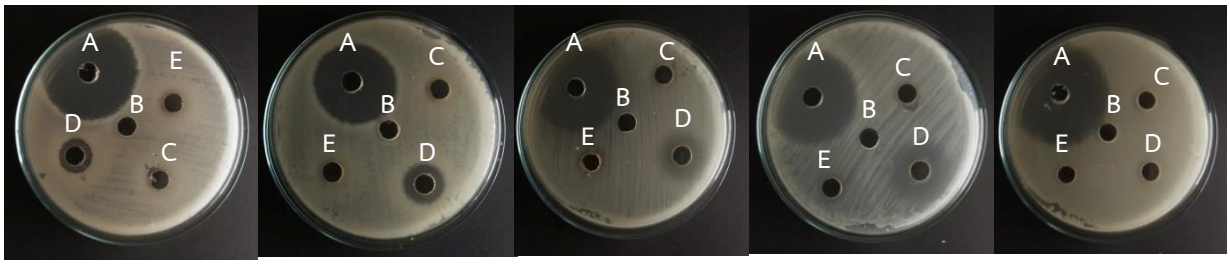
หมายเหตุ A) Positive control (1%chloramphenicol)

B) Negative control (น้ำกลั่น)

C) 1% Acetic acid

D) คอมบูชา (ระยะเวลาการหมัก 7 วัน)

เมื่อพิจารณาฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียของคอมบูชาที่หมักเป็นระยะเวลา 14 วัน พบว่า คอมบูชามีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ และสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้มากขึ้น โดยมีค่าดัชนีการยับยั้งแบคทีเรีย (AI) เท่ากับ 0.73±0.18, 1.30±0.24, 1.20±0.53 และ 1.91±0.28 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามไม่พบการยับยั้ง *E. coli* ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเกิดการย่อยสลายของเอนไซม์หรือโปรตีนออกฤทธิ์ทางชีวภาพเกิดขึ้น นอกจากนี้พบว่าชาดำไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ทุกสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ แสดงดังภาพที่ 5



B. subtilis *B. cereus* *Salmonella sp.* *S. aureus* *E. coli*

ภาพที่ 5 ฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียของคอมบูชาที่หมักเป็นระยะเวลา 14 วัน

หมายเหตุ A) Positive control (1%chloramphenicol)

B) Negative control (น้ำกลั่น)

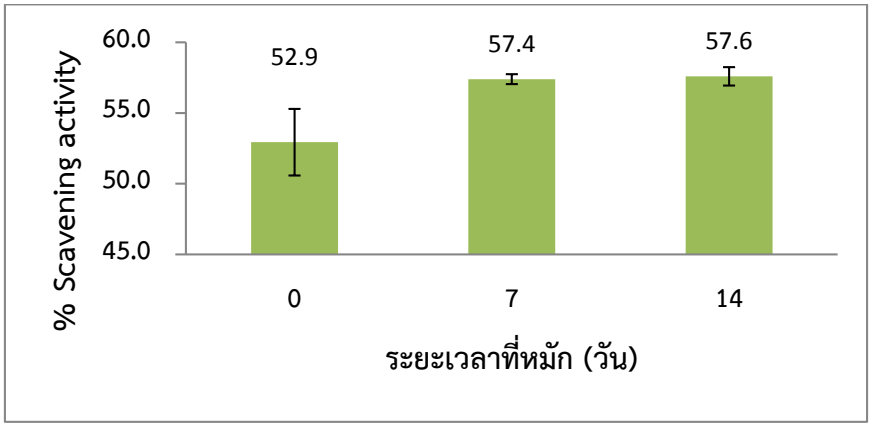
C) ชาดำ

D) คอมบูชา (ระยะเวลาการหมัก 14 วัน)

E) คอมบูชา ปรับค่าพีเอช เท่ากับ 6 (ระยะเวลาการหมัก 14 วัน)

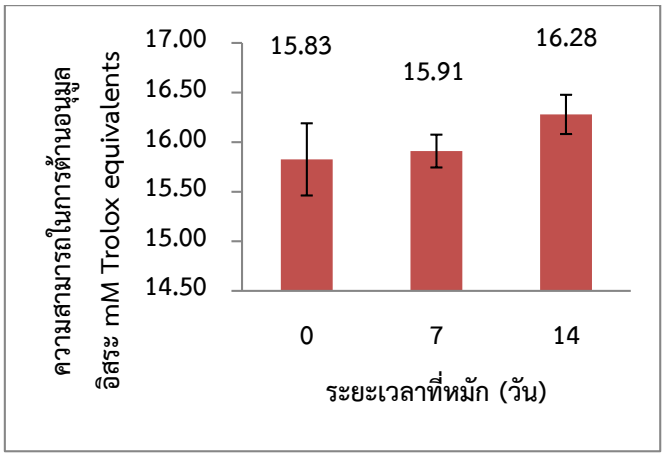
จากผลการทดลองวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของคอมบูชาด้วยวิธี DPPH พบว่า ค่า % Scavenging activity ของตัวอย่างคอมบูชาเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมัก โดยมีค่า% Scavenging activity เริ่มต้นของการหมัก

เท่ากับ 52.9±2.35 เปอร์เซ็นต์ (เทียบกับ ascorbic acid 236.53 μg/ml) และตัวอย่างคอมบูชาจากการหมักในวันที่ 14 ของการหมักมีค่า % Scavenging activity เท่ากับ 57.60±0.65 เปอร์เซ็นต์ (เทียบกับ ascorbic acid 257.30 μg/ml) ดังกราฟในภาพที่ 6



ภาพที่ 6 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างคอมบูชาที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ ด้วยวิธี DPPH

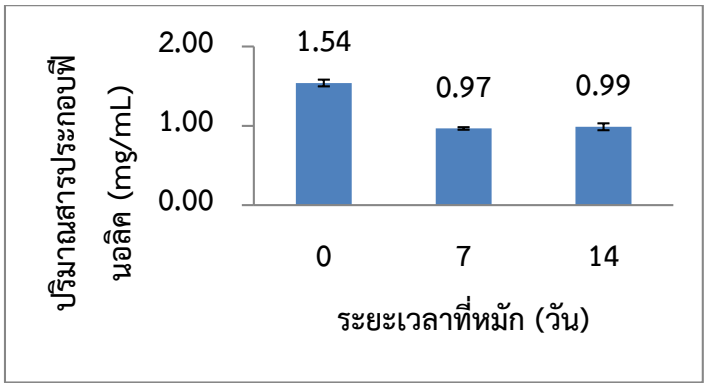
จากผลการทดลองวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของคอมบูชาด้วยวิธี ABTS พบว่าตัวอย่างคอมบูชาความสามารถต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมัก โดยความสามารถต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างคอมบูชาเริ่มต้นของการหมักเท่ากับ 15.83±0.36 mM Trolox equivalents และตัวอย่างคอมบูชาจากการหมักในวันที่ 14 ของการหมักมีความสามารถต้านอนุมูลอิสระ เท่ากับ 16.28 ±0.20 mM Trolox equivalents ดังกราฟในภาพที่ 7



ภาพที่ 7 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างคอมบูชาที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ ด้วยวิธี ABTS

จากผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างคอมบูชา จะเห็นได้ว่าเมื่อกระบวนการหมักคอมบูชาหัวเชื้อที่เป็นยีสต์และแบคทีเรียกรดอะซิติกจะเจริญและสร้างสารเมทาบอไลซ์หลายชนิด เช่น วิตามิน กรดอินทรีย์ เอนไซม์และโปรตีนที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งสารเมทาบอไลซ์ต่างๆ ดังกล่าวมีคุณสมบัติที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ (Chu and Chen, 2006)

จากผลการทดลองวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวมของคอมบูชาพบว่าปริมาณฟีนอลิกรวมของตัวอย่างคอมบูชาลดลงเล็กน้อย เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Panee และคณะ (2015) และปฏิญญา มั่นเกษตรกิจ (2016) โดยตัวอย่างคอมบูชาจากการหมักในวันที่ 14 ของการหมักมีปริมาณฟีนอลิกรวม เท่ากับ 0.99 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อมิลลิลิตร ดังกราฟในภาพที่ 8 ทั้งนี้เนื่องจากในชาประกอบด้วยสารประกอบฟีนอลิก ตัวอย่างเช่น catechins, theaflavins และ thearubigins เป็นต้น (Łuczaj และ Skrzydlewska, 2005; Sharangi, 2009)



ภาพที่ 8 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคตัวอย่างคอมบูชาที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ

ข้อเสนอแนะ

ข้อเสนอแนะในการนำผลวิจัยไปใช้

(1) จากการศึกษาจากงานวิจัยนี้สามารถนำข้อมูลที่เป็นองค์ความรู้เกี่ยวกับระยะเวลาการหมักคอมบูชาที่เหมาะสมเพื่อให้ได้สารสำคัญที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูงสุดในการพัฒนาผลิตภัณฑ์คอมบูชา

(2) จากการศึกษาจากงานวิจัยนี้สามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มคอมบูชาเพื่อสุขภาพต่อไปในอนาคต

ข้อเสนอแนะในการวิจัยครั้งต่อไป

(1) ศึกษาชนิดของสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆของตัวอย่างคอมบูชา

(2) ศึกษาคุณสมบัติของสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพของตัวอย่างคอมบูชา

เอกสารอ้างอิง

กิติพงศ์ อัศตรกุล และ นฤมล หิมะสุทธิเดช. (2560). ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของสารสกัดจากหัวหอมและการประยุกต์ใช้ในน้ำผักและผลไม้ผสม.วารสารเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยสยาม ปีที่ 12 ฉบับที่ 1 มกราคม – ธันวาคม 2560.71-83

ปฏิญญา มั่นเกษตรกิจ.(2016). การพัฒนาผลิตภัณฑ์คอมบูชาจากชาดำโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์.รายงานสืบเนื่องการประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับชาติและนานาชาติ ครั้งที่ 8 “Research 4.0 Innovation and Development SSRU’s 80th Anniversary”มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา: กรุงเทพมหานคร

ศูนย์วิจัยกสิกรไทย. (2562). ตลาดอาหาร-เครื่องดื่ม 'เพื่อสุขภาพ' พุ่ง 8.8 หมื่นล้าน. เข้าถึงได้จาก https://www.bangkokbiznews.com/news/detail/835566 (11 กุมภาพันธ์ 2563).

โอภา วัชรคุปต์. (2550). **สารต้านอนุมูลอิสระ Radical Scavenging Agent**. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพ: บริษัทนิวไทยมิตรการพิมพ์ (1996) จำกัด.

A.E. Sharangi. (2009). Medicinal and therapeutic potentialities of tea (*Camellia sinensis* L.) – A review, **Food Res. Int**. 42 529–535.

A. S. Velićanski, D.D. Cvetković, Markov, S.L., V. T. Tumbas Šaponjac and J.J. Vulić. (2014). Antioxidant and antibacterial activity of the beverage obtained by fermentation of sweetened Lemon Balm (*Melissa offi cinalis* L.) Tea with symbiotic consortium of bacteria and yeasts. **Food Technol. Biotechnol**. 52 (4) 420–429.

S.C. Chu, C. Chen. (2006). Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of kombucha. **Food Chem**. 98:502–507.

E. Mani-López, H.S. García, A. López-Malo. (2012). Organic acids as antimicrobials to control Salmonella in meat and poultry products, **Food Res. Int.**45: 713–721. http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.043

Panee Sririsa, Sakunnee Bovvonsombut, Chatchai Kitipornchai, Surapol Natakarnkitkul, Yingmanee Tragoolpua, Wipawan Pukampong, Tharinee Klawpiyapamornkun and Suwalee Kiatkarun. (2015). Development of Kombucha: Fermented tea beverage. **International Journal of Tae Science**. 11(1-2), 9-13.

W. Łuczaj, E. Skrzydlewska, Antioxidative properties of black tea, Prev. Med. 40 (2005) 910–918. http://://dx.doi.org/10.1016/j.ypmed.2004.10.014

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