

การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแบคทีเรียกรดอะซิติกและยีสต์ในการหมัก คอมบูชาเปลือกเมล็ดโกโก้

Changes of Acetic Acid Bacteria and Yeast Concentration during Cocoa Bean Shell Kombucha Fermentation

จันทิมา ชั่งสิริพร,^{1*} พฤกระยา พงศ์ยี่หล้า¹ และนิรนา ชัยฤกษ์¹
Juntima Chungsiriporn,^{1} Prukraya Pongyeela¹ and Nirana Chairerk¹*

Received 20 May 2023, Revised 26 June 2024, Accepted 28 June 2024

ABSTRACT

Kombucha is a fermented tea that contains beneficial bacteria and yeast, which are good for health. This research aims to determine the biological properties that occur during the fermentation process of Kombucha from cocoa bean shell. The approach involves the experimental design and the development of a mathematical model employing Response Surface Methodology (RSM) with key factors: tea concentration (X_1) ranging from 2% to 10%, starter liquid volume (X_2) ranging from 5 ml to 15 ml, and sugar concentration (X_3) ranging from 5% to 20%. The study also examines the fermentation duration and storage time in relation to the concentration of acetic acid bacteria and yeast. The results indicated that the most suitable condition were achieved with a 10% tea concentration, a starter liquid volume of 15 ml and a sugar concentration of 20%. A fermentation period of 7-10 days resulted in an acetic acid bacteria concentration was at 2.36×10^5 CFU/ml and the highest yeast concentration reaching 3.82×10^5 CFU/ml and a pH below 4 were suitable conditions for fermentation. Storing the Kombucha at room temperature and 4°C resulted in decreased concentration of acetic acid bacteria, yeast, and pH.

Keywords: Cocoa bean shell, Kombucha, Fermentation, Acetic acid bacteria, Yeast

บทคัดย่อ

คอมบูชา เป็นชาหมักที่มีแบคทีเรียและยีสต์ชนิดดีต่อร่างกาย มีประโยชน์ต่อระบบย่อยอาหาร งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อการศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชาจากเปลือกเมล็ดโกโก้ ออกแบบการทดลองและสร้างโมเดลทางคณิตศาสตร์ด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง (RSM) ที่มีปัจจัยของความเข้มข้นของชา (X_1) 2-10% ปริมาณน้ำหัวเชื้อตั้งต้น (X_2) 5-15 มล. และความเข้มข้นของน้ำตาล (X_3) 5-20% รวมทั้งศึกษาระยะเวลาการหมักและการเก็บรักษาต่อความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกและยีสต์ พบว่า สภาวะความเข้มข้นของชา 10% ปริมาณน้ำหัวเชื้อตั้งต้น 15 มล. และความเข้มข้นของน้ำตาล 20% ระยะเวลาการหมัก 7-10 วัน มีความเหมาะสมทำให้ความเข้มข้นของแบคทีเรียกรดอะซิติกสูงสุด เท่ากับ 2.36×10^5 CFU/ml และความเข้มข้นสูงสุดของยีสต์ เท่ากับ 3.82×10^5 CFU/ml โดยมีค่า pH ต่ำกว่า 4 เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการหมัก โดยการเก็บรักษาคอมบูชาในอุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 4°C ส่งผลให้ความเข้มข้นของแบคทีเรียกรดอะซิติก ยีสต์ และค่า pH ลดลง

คำสำคัญ: เปลือกเมล็ดโกโก้ คอมบูชา การหมัก แบคทีเรียกรดอะซิติก ยีสต์

^{1*} สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ต.คอหงส์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90110

Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Prince of Songkla University, Kho Hong Sub-District, Hat Yai District, Songkhla 90110, Thailand.

* Corresponding author: Tel. 074-2887304, E-mail address: juntima.c@psu.ac.th

คำนำ

ชาหมักหรือคอมบูชา (Kombucha) เป็นเครื่องดื่มที่คนรู้จักกันเคยมานาน ส่งผลดีต่อสุขภาพ เนื่องจากประกอบด้วยเชื้อจุลินทรีย์และยีสต์ที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย ทั้งยังอุดมไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระที่ช่วยทำลายเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค คอมบูชาเกิดจากการนำน้ำชา น้ำตาล จุลินทรีย์ และยีสต์ไปหมักรวมกันอย่างน้อย 1 สัปดาห์ จนออกมาเป็นเครื่องดื่มที่มีฤทธิ์เป็นกรด โดยมีส่วนผสมหลักเป็นกรดน้ำส้มหรือกรดอะซิติก (acetic acid) รวมถึงวิตามินบีและสารต่างๆ มากมาย เมื่อดื่มชาชนิดนี้จะให้ความรู้สึกซ่าและมีกลิ่นแอลกอฮอล์เล็กน้อย โดยระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชา เชื้อแบคทีเรียและยีสต์จะมีการแบ่งตัวจนเห็นเป็นแผ่นฟิล์มลักษณะคล้ายกลุ่มเห็ดเคลือบอยู่บนผิวของเหลว เรียกกลุ่มแบคทีเรียและยีสต์ที่มีชีวิตนี้ว่า SCOBY ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับหมักคอมบูชาครั้งต่อไปได้ (เอกชัย, 2558)

กระบวนการหมักชาอาศัยจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียที่ผลิตกรดอะซิติกและกลุ่มยีสต์ซึ่งที่สามารถเปลี่ยนน้ำตาลซูโครส (sucrose) ให้เป็นน้ำตาลฟรุกโตส (fructose) และกลูโคส (glucose) ในการผลิตเอทานอล แอลกอฮอล์จะกระตุ้นการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ผลิตกรดอะซิติก ซึ่งสามารถเปลี่ยนกลูโคสให้เป็นกรดกลูโคนิก (gluconic acid) และเปลี่ยนฟรุกโตสให้เป็นกรดอะซิติก ก่อให้เกิดจุลินทรีย์และยีสต์สายพันธุ์ดีปริมาณมากซึ่งดีต่อระบบย่อยอาหารของร่างกาย โดยจะไปทดแทนจุลินทรีย์สายพันธุ์ดีในระบบย่อยอาหารที่สูญเสียไปจากหลายสาเหตุ เช่น การกินอาหารไม่สะอาดหรือการใช้ยาบางชนิด ช่วยดีท็อกซ์ (detox) กำจัดสารพิษที่เป็นอันตรายต่อร่างกาย (Vina et al. 2014) ช่วยรักษาและป้องกันโรคทางเดินอาหารบางชนิดได้ด้วย ได้แก่ อาการท้องเสียจากการติดเชื้อหรือท้องเสียจากยาปฏิชีวนะ ลำไส้อักเสบ และลำไส้แปรปรวน เป็นต้น

เปลือกเมล็ดโกโก้ (Cacao bean shell) มีจุลินทรีย์ที่เกิดจากการหมักเมล็ด ประกอบด้วย ยีสต์และแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียกลุ่มแลคติกที่พบในกระบวนการหมักเมล็ด ได้แก่ กลุ่มแลคโตบาซิลลัสและแลคโตคอคคัส ส่วนยีสต์ เช่น *Hanseniaspora guilliermondii* และ *Pichia kudriavzevii* (Ho et al., 2014) และยังประกอบด้วยสารสำคัญ เช่น สารประเภทพอลิฟีนอล (polyphenols) หรือสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoid) เช่น เควอซีทิน (quercetin) คาทีชิน (catechin) และอีพิกาทีชิน (epicatechin) เป็นต้น (Poveda, 2020) ซึ่งมีประโยชน์ในการป้องกันโรคเรื้อรังต่าง ๆ เช่น มะเร็ง เบาหวาน กลุ่มโรคหลอดเลือดหัวใจ และมีฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของระบบประสาทส่วนกลาง เป็นต้น ดังนั้น เปลือกเมล็ดโกโก้แห้งจึงเป็นแหล่งของจุลินทรีย์ธรรมชาติและสารออกฤทธิ์สำคัญที่สามารถนำไปหมักเครื่องดื่มคอมบูชาได้

วิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology, RSM) เป็นวิธีการทางวิทยาศาสตร์และสถิติที่เป็นประโยชน์ ในการสร้างแบบจำลองและวิเคราะห์ปัญหา ซึ่งแสดงผลตอบสนองต่อผลจากตัวแปรต่าง ๆ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อหาจุด หรือความเหมาะสมต่อผลนั้น ทำให้ง่ายในการจัดการและการอธิบายผลเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการอื่น (Box and Behnken, 1960)

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชา โดยการออกแบบการทดลองด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง โดยศึกษาปัจจัยความเข้มข้นของชา ปริมาณน้ำหัวเชื้อตั้งต้น และปริมาณน้ำตาล ระยะเวลาในการหมัก และกระบวนการเก็บรักษาคอมบูชา ที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแบคทีเรียกรดอะซิติกและยีสต์ในชาหมักคอมบูชา ทำให้ได้สภาวะที่เหมาะสมในการผสมสัดส่วนชา น้ำตาล และน้ำหัวเชื้อจุลินทรีย์ และระยะเวลาที่เหมาะสมในการหมักชาหมัก

อุปกรณ์และวิธีการ

การออกแบบการทดลองและวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง

ออกแบบการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักคอมบูชาจากเปลือกเมล็ดโกโก้ โดยใช้การทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) (Subseree, 2009) ซึ่งมีตัวแปรที่มีอิทธิพล จำนวน 3 ตัวแปร ได้แก่ ความเข้มข้นของชาโกโก้ (X_1) ปริมาณ

น้ำหัวเชื้อตั้งต้น (X_2) และความเข้มข้นของน้ำตาล (X_3) (Table 1) ข้อมูลจากการหมักจะถูกวิเคราะห์โดยวิธีพื้นผิวตอบสนองด้วยสมการพหุนามกำลังสอง (Second-Order Polynomial Equation) ซึ่งจะอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างค่าผลตอบสนอง (แบคทีเรียกรดอะซิติกและยีสต์) ที่ได้จากการทำนายและค่าตัวแปรอิสระของการสกัดโดยที่สมการพหุนามกำลังสองดังสมการที่ (1) (Ziegel *et al.*, 1997)

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{iii} X_i X_j \quad (1)$$

Y คือ ค่าทำนายแบคทีเรียกรดอะซิติกและยีสต์

β_0 คือ พารามิเตอร์ค่าคงที่ (intercept)

β_i คือ ค่าสัมประสิทธิ์ที่เกี่ยวข้องกับตัวแปรอิสระ X_i

β_{ij} คือ ค่าสัมประสิทธิ์ที่เกี่ยวข้องกับกำลังสองของตัวแปร X_i^2

β_{ii} คือ ค่าสัมประสิทธิ์ที่เกี่ยวข้องกับการมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร $X_i X_j$

โดยนำสภาวะที่เหมาะสมจากการทำนายสร้างความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของชา (X_1) ปริมาณน้ำหัวเชื้อตั้งต้น (X_2) และความเข้มข้นของน้ำตาล (X_3) ต่อความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติก (Y_1) ดังสมการที่ (2)

$$Y_1 = 0.830 + 0.447X_2 + 0.387X_3 - 0.159X_1X_3 + 0.278X_1^2 \quad (2)$$

$$R^2 = 0.9640$$

สร้างความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของชา (X_1) ปริมาณน้ำหัวเชื้อตั้งต้น (X_2) และ

ความเข้มข้นของน้ำตาล (X_3) ต่อความเข้มข้นของยีสต์ (Y_2) ดังสมการที่ (3)

$$Y_2 = 1.730 + 0.480X_1 + 0.296 + 0.524X_1X_2 + 0.259X_2X_3 \quad (3)$$

$$R^2 = 0.9312$$

Table 1 Factor and factor level of Central Composite Design

Factor	Level		
	-1	0	1
Tea concentration (%)	2	6	10
Starter liquid (ml)	5	10	15
Sugar concentration (%)	5	12.5	20

การเตรียมคอมบูชา

เตรียมคอมบูชา ที่ความเข้มข้น 2-10% โดยต้มเปลือกเมล็ดโกโก้ในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที เตรียมน้ำตาลความเข้มข้น 5-20% และน้ำหัวเชื้อตั้งต้น ค่า pH 2.52 ทำการผสมส่วนประกอบต่าง ๆ

ในสัดส่วนที่กำหนดสิ่งทดลองตามที่ออกแบบจากโปรแกรม RSM จากนั้นใส่แผ่นหัวเชื้อคอมบูชา (scoby) ปริมาณร้อยละ 20 (v/v) ปิดฝาโหลด้วยผ้าขาวบางมัดด้วยเชือก บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 7 วัน

วิเคราะห์ความเข้มข้นของแบคทีเรียกรดอะซิติกและยีสต์

วิเคราะห์ความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติก ยีสต์ และค่า pH จากตัวอย่างชาโกโก้หมักที่ระยะเวลาการหมัก 7, 10, 13 และ 16 วัน และการเก็บรักษาตัวอย่างคอมบูชาหลังการหมักที่อุณหภูมิห้องและแช่เย็น ระยะเวลา 3, 6 และ 9 วัน โดยวัดความเข้มข้นของแบคทีเรียกรดอะซิติกและยีสต์ใช้เทคนิค Spread Plate บนอาหาร Glucose yeast extract calcium carbonate agar (GYC agar, HiMedia Laboratories, India) และอาหาร Yeast Extract Peptone Dextrose Agar (YEPD agar, HiMedia Laboratories, India) ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนโคโลนี ด้วยวิธี Spread

Plate เป็นการนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิต และมาคำนวณรายงานเป็นค่า CFU/mL (นิสา และคณะ, 2564)

ผลการทดลอง

จากการศึกษาสภาวะในการหมักคอมบูชาจากชาเปลือกเมล็ดโกโก้ ด้วยการศึกษปัจจัยความเข้มข้นของชา (2-10%) ปริมาณน้ำหัวเชื้อตั้งต้น (5-15 มล.) และความเข้มข้นของน้ำตาล (5-20%) ที่ระยะเวลาหมัก 7 วัน พบว่าความสัมพันธ์ของปริมาณน้ำหัวเชื้อตั้งต้น (X_2) และความเข้มข้นของน้ำตาล (X_3) มีผลต่อความเข้มข้นของแบคทีเรียกรดอะซิติก ส่วนความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของชา (X_1) และความเข้มข้นของน้ำตาล (X_3) มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของยีสต์ แสดงดัง Table 2

Table 2 The probability value obtained from response surface analysis

Factor	Acetic acid bacteria (CFU/ml)	Yeast (CFU/ml)
X_1	-	0.0001
X_2	0.0001	-
X_3	0.0001	0.0030
$X_1 X_2$	-	0.0001
$X_1 X_3$	0.0266	0.0003
$X_2 X_3$	-	0.0112
X_1^2	0.0250	-
X_2^2	-	-
X_3^2	-	-

1. ความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติก

จากผลการทดลอง Figure 1 พบว่า สภาวะที่เหมาะสม ของการหมักชาที่ทำให้ได้ความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกสูงสุด เท่ากับ

2.36×10^5 CFU/ml คือ สภาวะความเข้มข้นของชา 10% ปริมาณน้ำหัวเชื้อตั้งต้น 15 มล. และความเข้มข้นของน้ำตาล 20% โดยความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกจะเพิ่มขึ้นตามปริมาณน้ำหัวเชื้อตั้งต้นและความเข้มข้นของน้ำตาลที่เติมในกระบวนการอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

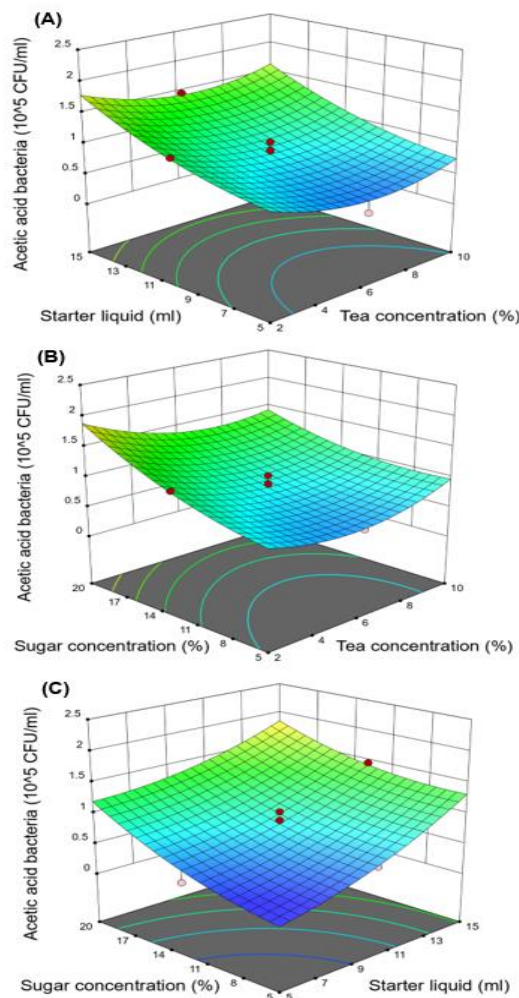


Figure 1 The relationship between tea concentration, starter liquid, and the concentration of sugar on the amount of acetic acid bacteria

2. ความเข้มข้นของยีสต์

จาก Figure 2 พบว่า สภาวะที่เหมาะสมของสภาวะการหมักคอมบูชาจากชาเปลือกเมล็ดโกโก้ที่ทำให้ได้ความเข้มข้นของยีสต์สูงสุด เท่ากับ 3.82×10^5 CFU/ml คือ สภาวะความเข้มข้นของชา

10% ปริมาณน้ำหัวเชื้อตั้งต้น 15 มล. และความเข้มข้นของน้ำตาล 20% โดยความเข้มข้นของยีสต์จะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของชา และความเข้มข้นของน้ำตาลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

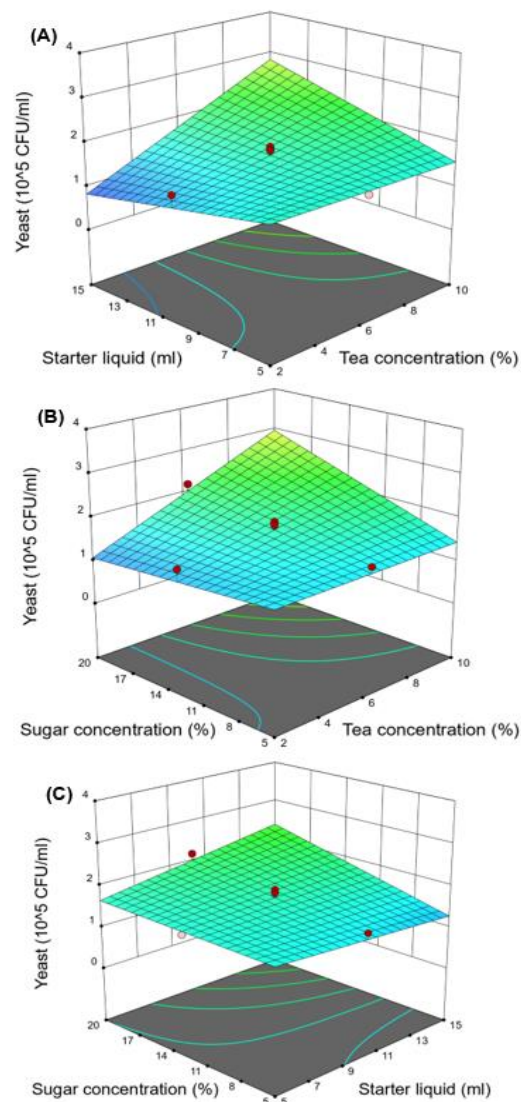


Figure 2 The relationship between tea concentration, starter liquid, and the concentration of sugar on the amount of yeast

3. ค่า pH

หลังการหมักชาหมักเป็นระยะเวลา 7 วัน ผลของค่า pH พบว่า ค่า pH ของชาอยู่ในช่วง 2.54-3.16 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ซึ่งมีค่า pH เหมาะสมที่ไม่เสี่ยงต่อการเกิดเชื้อราของชาหมัก ($pH < 4$) ซึ่งค่า pH ต่ำ แสดงถึงสภาวะความเป็นกรด ทำให้เชื้อราไม่สามารถเจริญเติบโตได้ บ่งบอกถึงการหมักที่มีประสิทธิภาพ ความเป็นกรดของชาหมัก ที่มี pH 2-4 ช่วยเพิ่มความเป็นกรดในกระเพาะอาหาร ช่วยให้การย่อยดีขึ้น

4. ผลของระยะเวลาการหมัก

ที่ระยะเวลาการหมัก 7, 10, 13 และ 16 วัน ของชาหมักคอมบูชาที่สภาวะความเข้มข้นของชา 6% ปริมาณน้ำหัวเชื้อตั้งต้น 10 มล. และความเข้มข้นของน้ำตาล 12.5% มีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติก ยีสต์ และค่า pH แสดงดัง Figure 3 และ Figure 4 ตามลำดับ พบว่า ความเข้มข้นของแบคทีเรียอะซิติกจะมีค่าสูงสุด เท่ากับ 1.30×10^5 CFU/ml ที่ระยะเวลาหมัก 10 วัน และมีค่าลดลงที่ระยะเวลาหมัก 13 และ 16 วัน ส่วนความ

เข้มข้นของยีสต์มีแนวโน้มลดลงหลังจากการหมักที่ระยะเวลา 7 วัน โดยมีค่าสูงสุด เท่ากับ 1.84×10^5

CFU/ml และค่า pH ของชาหมักจะมีค่าลดลงตามระยะเวลาการหมักที่เพิ่มขึ้น

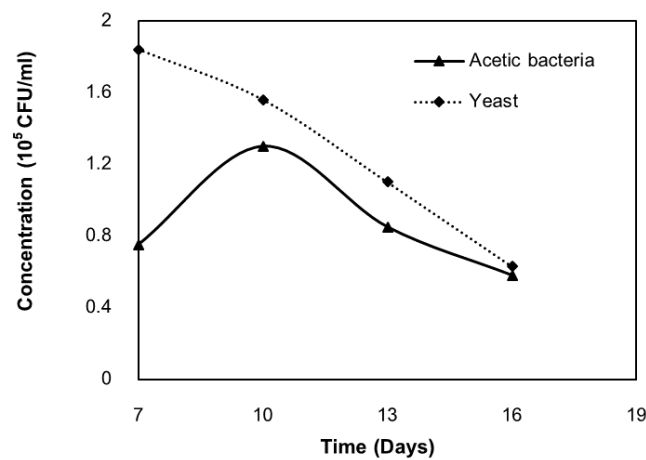


Figure 3 The concentration of acetic acid bacteria and yeast during fermentation at 7, 10, 13 and 16 days

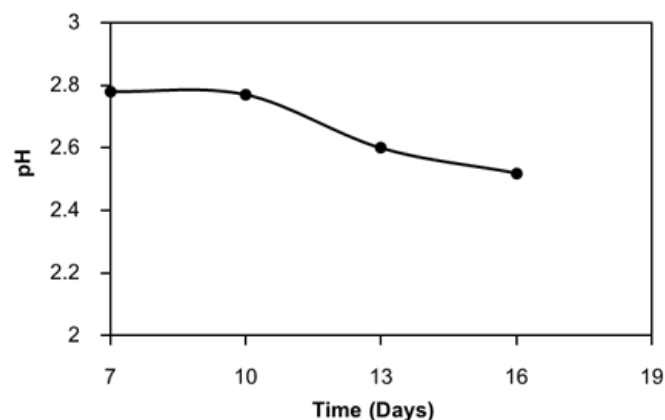


Figure 4 The pH of kombucha during fermentation at 7, 10, 13 and 16 days

5. ผลของระยะเวลาการเก็บรักษา

เปรียบเทียบการเก็บรักษาคอมบูชาที่สภาวะความเข้มข้นของชา 6% ปริมาณน้ำหัวเชื้อตั้งต้น 10 มล. และความเข้มข้นของน้ำตาล 12.5% ด้วยการเก็บที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 4°C ต่อการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติก (Figure 5) ยีสต์ (Figure 6) และค่า pH (Figure 7) พบว่า ความเข้มข้นของแบคทีเรียกรดอะซิติก ยีสต์ และค่า pH มีค่าลดลงในช่วงระยะเวลาการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 4°C โดยความเข้มข้นของแบคทีเรียอะซิติกมีค่าเพิ่มขึ้นใน

ระยะเวลาการเก็บรักษา 3 วัน และลดลงเหลือ 0.01×10^5 CFU/ml ที่ระยะเวลาการเก็บ 9 วัน ทั้งการเก็บ 2 สภาวะ เช่นเดียวกับความเข้มข้นของยีสต์ที่ลดลงจาก 1.84×10^5 CFU/ml เหลือ 0.01×10^5 และ 0.03×10^5 CFU/ml ที่การเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 4°C ตามลำดับ และค่า pH ลดลงจาก 2.82 เป็น 2.76 และ 2.48 การเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 4°C ตามลำดับ โดยการเก็บคอมบูชาที่อุณหภูมิ 4°C จะมีค่า pH ต่ำกว่าการเก็บที่อุณหภูมิห้อง

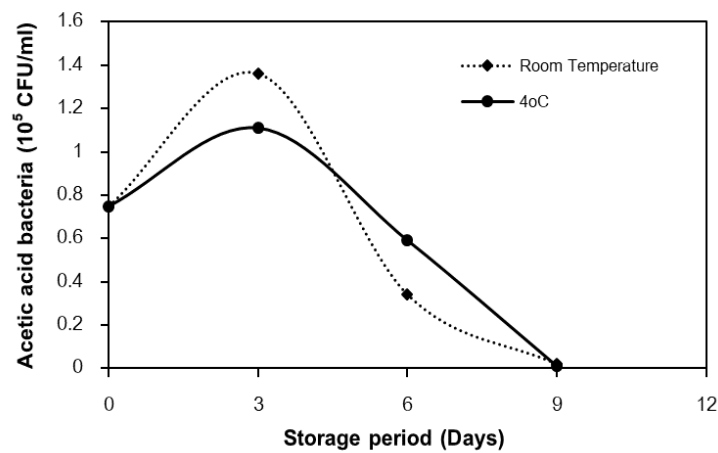


Figure 5 The concentration of acetic acid bacteria during storage period at 3, 6 and 9 days

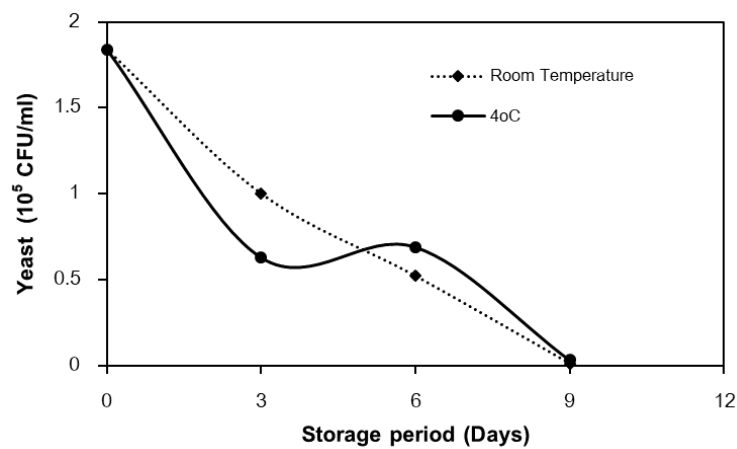


Figure 6 The concentration of yeast during storage period at 3, 6 and 9 days

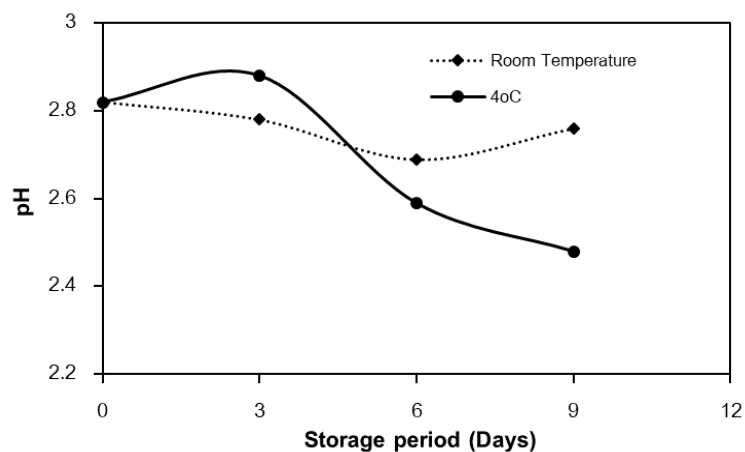


Figure 7 The pH of Kombucha during storage period at 3, 6 and 9 days

วิจารณ์

กระบวนการหมักคอมบูชาอาศัยเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำงานร่วมกันในสองชนิดประกอบด้วยแบคทีเรียกรดอะซิติกและยีสต์ (Dufresne and Fammorth,

2000) ในช่วงระยะเริ่มต้นของกระบวนการหมักยีสต์จะทำหน้าที่ย่อยน้ำตาลซูโครสให้เป็นกลูโคส และฟรุกโตส (Balentine, 1997) และเปลี่ยนน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวให้เป็นแอลกอฮอล์และกรดอินทรีย์ จึงมี

ความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียกรดอะซิติก สภาวะการหมักที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูงจึงเป็นสภาวะที่ทำให้เกิดยีสต์และแบคทีเรียกรดอะซิติกสูง เนื่องจากน้ำตาลซูโครสจัดเป็นแหล่งคาร์บอนชั้นดีให้แก่จุลินทรีย์แบคทีเรียกรดอะซิติก (Martin and Demain, 1980) ในระดับความเข้มข้น 5–20% (Vina *et al.*, 2013) เช่นเดียวกันกับการเติมน้ำหัวเชื้อตั้งต้นที่มีส่วนประกอบของกรดอะซิติกสูงมีความเป็นกรดที่มีผลต่อการเพิ่มความเข้มข้นของแบคทีเรียกรดอะซิติกเช่นกัน ซึ่งเปลือกเมล็ดโกโก้มีจุลินทรีย์ที่ประกอบด้วย ยีสต์และแบคทีเรียที่ช่วยในกระบวนการหมัก ความเข้มข้นของชาเปลือกเมล็ดโกโก้จึงมีผลต่อการเพิ่มความเข้มข้นของแบคทีเรียกรดอะซิติกและยีสต์ และส่งผลให้มีค่า pH ต่ำ ในช่วง 2.54-3.16

ระยะเวลาการหมักชาคอมบูชาเป็นปัจจัยที่สำคัญในการหมักชา โดยความเข้มข้นของแบคทีเรียอะซิติกจะมีค่าเพิ่มขึ้นสูงสุดที่ระยะเวลาหมัก 10 วัน และมีแนวโน้มลดลง เช่นเดียวกับค่า pH ที่มีค่าลดลงจากการหมัก 10 วัน ส่วนความเข้มข้นของยีสต์มีแนวโน้มลดลงหลังจากการหมักวันที่ 7 เนื่องจากยีสต์มีการถูกใช้ไปย่อยน้ำตาลทำให้มีความเข้มข้นลดลงเมื่อระยะเวลาการหมักผ่านไป 7 วัน ด้วยการเกิดสภาวะที่มีแอลกอฮอล์ทำให้การเจริญของแบคทีเรียกรดอะซิติกสูงขึ้นในวันที่ 10 และในช่วงหลังวันที่ 10 แบคทีเรียกรดอะซิติกจะนำเอทานอลมาผลิตกรดอะซิติกส่งผลให้ความเข้มข้นของแบคทีเรียกรดอะซิติก ยีสต์ และค่า pH ลดลง เมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น ซึ่งเกิดจากการสร้างกรดอินทรีย์จากการใช้กลูโคสของจุลินทรีย์ (Haavik, 1974)

ในกระบวนการหมักมีค่า pH ต่ำกว่า 4 ที่ช่วยลดการปนเปื้อนจุลินทรีย์ชนิดอื่นระหว่างกระบวนการหมัก (สาวิตรี, 2549) การควบคุมระดับ pH ในระหว่างการหมักคอมบูชาเป็นปัจจัยที่สำคัญ เนื่องจากหากระดับค่า pH เท่ากับ 4.2 ควรหยุดกระบวนการหมักเนื่องจากการผลิตกรดอะซิติกมากเกินไปอาจทำให้เกิดการต่อต้าน (Kovacevic *et al.*, 2014) ซึ่งขั้นตอน

สำคัญของการผลิตชาหมัก คือ การควบคุมกิจกรรมการหมัก ซึ่งเกี่ยวข้องกับหลายปัจจัย ได้แก่ ชนิดปริมาณ รวมทั้งสัดส่วนของกล้าเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก และการเก็บรักษา (Watawana *et al.*, 2015)

จากการทดลอง พบว่า การเก็บรักษาชาหมักมีผลต่อการลดลงของความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกและยีสต์ทั้งการเก็บในอุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 4°C ซึ่งมีความเข้มข้นลดลงอย่างมากในการเก็บที่ระยะเวลา 9 วัน โดยการเก็บที่อุณหภูมิห้องประมาณ 32°C อาจเป็นสภาวะที่ทำให้เชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกและยีสต์ตายเนื่องจากความร้อน อีกทั้งในสภาวะที่มีความเย็นและความชื้นต่ำ จะลดการเติบโตของเชื้อแบคทีเรียและยีสต์อย่างมีนัยสำคัญทำให้มีความเข้มข้นลดลงอย่างรวดเร็ว

คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสาขาวิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่สนับสนุนสถานที่การทำงานวิจัยในครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- นิสา ร่มสัมช่า จุฑามาศ พรสันเทียะ ทิพย์วรินทร์ ริมลาดวน และกุนทิกา เวชกลาง. (2564). คุณสมบัติทางชีวภาพของผลิตภัณฑ์คอมบูชาที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก. *วารสารนเรศวรพะเยา*, 14(1), 76-87.
- สาวิตรี ลิ้มทอง. (2549). *ยีสต์: ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ*. (น. 611). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เอกชัย จารุเนตรวิลาส. (2558). *อาหารฟังก์ชัน*. อุดรธานี: มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี.
- Balentine, D. A. (1997). tea and health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 37(8), 691-692. doi: 10.1080/10408399709527796.

- Box, G. E. P., and Behnken, D. W. (1960). Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics*, 2(4), 455-475. doi: 10.2307/1266454.
- Dufresne, C., and Farnworth, E. (2000). Tea, kombucha, and health: a review. *Food Research International*, 33(6), 409-421. doi: 10.1016/S0963-9969(00)00067-3.
- Haavik, H.I. (1974). Studies on the formation of bacitracin by *Bacillus licheniformis*: effect of glucose, *Journal of General Microbiology*, 81(2), 383-390. doi: 10.1099/00221287-81-2-383.
- Ho, V.T, Zhao, J., and Fleet, G. (2014). Yeasts are essential for cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 17, 72-87. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.014.
- Kovacevic, Z., Davidovic, G., Filipović, J., and Popovic, A. (2014). A toxic hepatitis caused the kombucha tea – case report. *Macedonian Journal of Medical Sciences*, 7(1) , 128- 131. doi: 10. 3889/oamjms.2014.023.
- Martin, J.F., and Demain, A.L. (1980) Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiological Reviews*, 44, 230-251.
- Poveda, O. R. , Pereira, L. B. , Zeppa, G. , and Stévigny, C. (2020). Cocoa bean Shell-A by product with nutritional properties and biofunctional potential. *Nutrients*, 12(4) , 11-23.
- Subseree, J. (2009). *DOE Central composite design*. Retrieved June 4, 2016, from http://www.tpa.or.th/publisher/pdfFileDownloadS/FQ145_p72-74.pdf.
- Vina, I., Linde, R., Patetko, A., and Semjonovs, P. (2013). Glucuronic acid from fermented beverages: biochemical functions in humans and its role in health protection. *International Journal of Recent Research and Applied Studies*, 14(2), 217–230.
- Vina, L., Semjonovs, P., Linde, R., and Deniņa. L. (2014). Current evidence on physiological activity and expected health effects of kombucha fermented beverage. *Journal of Medicinal food*, 17(2), 179-188. doi: 10.1089/jmf.2013.0031..
- Watawana, M. I., Jayawardena, N., Gunawardhana, C. B., and Waisundara, V.Y. (2015). Health, wellness, and safety aspects of the consumption of kombucha. *Journal of Chemistry*, 2015(1), 1-11. doi: 10.1155/2015/591869.
- Ziegel, E. R., Khuri, A., and Cornell, J. (1997). Response surfaces: Designs and analyses. *Technometrics*, 39(3), 342. doi: 10.1080/00401706.1997.10485140.