



บทความวิจัย (Research Article)

Volume 4, No. 1, January – June 2025, ISSN : 2821-9066 (Print)

การเปรียบเทียบคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และการประเมิน ปริมาณจุลินทรีย์ใน kombucha กาแฟชนิดที่มีคาเฟอีนและไม่มีคาเฟอีน Comparison of Physicochemical Properties, Antioxidant Activity and Microbial Content of Caffeinated and Non-caffeinated Coffee Kombucha

กัญญารัตน์ จันทะมาตย์ มณฑิชา ใจมั่น สุภาดา ละครไชย์ วิลาวัลย์ บุญย์สุภา* พันธิวา แก้วมาตย์ และสุภัทรา จินากูล
Kanyarat Chanthamat, Monthicha Jaiman, Supada Lakonchai, Wilawan Boonsupa*,
Puntivar Kaewmad and Supattra Chinakool

สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
Department of Biology, Faculty of Science and Technology, Rajabhat Maha Sarakham University
Corresponding author e-mail: wilawan.wi@rmu.ac.th

Received: May 13, 2025/ Revised: June 20, 2025/ Accepted: June 23, 2025

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติทางเคมี ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณจุลินทรีย์ใน kombucha ที่ผลิตจากกาแฟมีคาเฟอีนและไม่มีคาเฟอีน โดยหมักเป็นเวลา 12 วัน เก็บตัวอย่างทุก 3 วัน รวม 5 ช่วงเวลา (วันที่ 0, 3, 6, 9 และ 12) การวิเคราะห์ kombucha ประกอบด้วย การวัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (องศาบริกซ์) ปริมาณน้ำตาลฟรุกโตส กลูโคส และกรดอะซิติก ด้วยเครื่อง HPLC วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH วิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมด้วยวิธี Aluminium chloride colorimetric assay วิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu และวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ด้วยวิธี Spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA และ SDA ผลการศึกษาวิเคราะห์ kombucha ที่หมักเป็นเวลา 12 วันพบว่า kombucha กาแฟมีคาเฟอีนและ kombucha กาแฟไม่มีคาเฟอีนมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ 6.80 ± 0.00 และ 6.10 ± 0.14 องศาบริกซ์ ตามลำดับ ปริมาณฟรุกโตส 4.98 ± 0.18 เปอร์เซ็นต์ และ 5.41 ± 0.06 เปอร์เซ็นต์ กลูโคส 5.13 ± 0.33 เปอร์เซ็นต์ และ 5.27 ± 0.16 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซิติก 1.20 ± 0.17 เปอร์เซ็นต์ และ 2.73 ± 0.07 เปอร์เซ็นต์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 27.25 ± 0.24 และ 23.67 ± 0.35 มิลลิกรัมของกรดแอสคอร์บิก/มิลลิลิตร ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม 759.86 ± 9.09 และ 545.57 ± 1.01 ไมโครกรัมของรูทีน/มิลลิลิตร ปริมาณสารฟีนอลิก 2134.78 ± 4.99 และ 1662.12 ± 5.41 มิลลิกรัมของกรดแกลลิก/ลิตร ปริมาณแบคทีเรีย 4.85×10^{14} และ 4.35×10^{15} CFU/ml และปริมาณยีสต์-รา 5.50×10^{14} และ 5.85×10^{13} CFU/ml

ตามลำดับ ผลการศึกษาสรุปได้ว่า คอมบูชาที่ผลิตจากกาแฟมีคาเฟอีนมีคุณสมบัติทางเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่า คอมบูชาจากกาแฟไม่มีคาเฟอีน

คำสำคัญ: ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, คอมบูชากาแฟมีคาเฟอีน, คอมบูชากาแฟไม่มีคาเฟอีน, ปริมาณจุลินทรีย์

Abstract

This study aimed to compare the chemical properties, antioxidant activity and microbial content of kombucha produced from caffeinated and decaffeinated coffee fermented for 12 days. Samples were collected every 3 days for 5 time points (day 0, 3, 6, 9 and 12). Kombucha analysis consisted of measurement of soluble solids (degree Brix), fructose, glucose and acetic acid by HPLC, antioxidant activity by DPPH method, total flavonoids by Aluminium chloride colorimetric assay and total phenolics by Folin-Ciocalteu method. And the microbial quantity was analyzed by Spread plate method on PCA and SDA media. The results of the analysis of kombucha fermented for 12 days showed that coffee kombucha with caffeine and coffee kombucha without caffeine had soluble solids of 6.80 ± 0.00 and 6.10 ± 0.14 degree Brix, respectively, fructose content of 4.98 ± 0.18 percent and 5.41 ± 0.06 percent, glucose of 5.13 ± 0.33 percent and 5.27 ± 0.16 percent, acetic acid of 1.20 ± 0.17 percent and 2.73 ± 0.07 percent, antioxidant activity of 27.25 ± 0.24 and 23.67 ± 0.35 mg of ascorbic acid/ml, and total flavonoid content of 759.86 ± 9.09 and 545.57 ± 1.01 microgram of rutin/ml. The phenolic contents were 2134.78 ± 4.99 and 1662.12 ± 5.41 mg of gallic acid/L, the bacterial counts were 4.85×10^{14} and 4.35×10^{15} CFU/ml, and the yeast-mold counts were 5.50×10^{14} and 5.85×10^{13} CFU/ml, respectively. The results of the study concluded that kombucha produced from caffeinated coffee had higher chemical properties and antioxidant activity than kombucha from decaffeinated coffee.

Keywords: Antioxidant activity, caffeinated coffee kombucha, decaffeinated coffee kombucha, microbial content

บทนำ

คอมบูชา (Kombucha) เป็นเครื่องดื่มหมักที่ได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้นในปัจจุบัน โดยทั่วไปผลิตจากการหมักชาเขียวหรือชาดำกับน้ำตาล และหัวเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast (SCOBY) ซึ่งประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อร่างกายทั้งในกลุ่มแบคทีเรียและยีสต์ ผลลัพธ์ที่ได้มีลักษณะเป็นเครื่องดื่มรสเปรี้ยวเล็กน้อย มีความซ่าจากกระบวนการหมัก และมีสารประกอบที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น กรดอินทรีย์ สารต้านอนุมูลอิสระ สารฟีนอลิก และสารฟลาโวนอยด์ ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ (นันทน์ภัส พิสิษฐ์อาภาภัก และศุภาพิชญ์ ทองรัตน์, 2563) ในปัจจุบัน มีการประยุกต์ใช้วัตถุดิบหลากหลายชนิดแทนการใช้ชาแบบดั้งเดิมในการผลิตคอมบูชา เช่น สมุนไพร ผลไม้ และเครื่องดื่มประเภทอื่น ๆ หนึ่งในวัตถุดิบที่ได้รับความนิยมคือกาแฟ เนื่องจากกาแฟมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิด เช่น กรดคลอโรจีนิก คาเฟอีน และสารต้านอนุมูลอิสระ จึงคาดว่ากาแฟมาใช้ในการหมักคอมบูชาจะช่วยเสริมคุณค่าทางสุขภาพของผลิตภัณฑ์ (ปิยวรรณ พันสี และคณะ, 2567)

Karyantina et al., (2024) ได้ทำการศึกษาคอมบูชาทำมาจากกาแฟ กาแฟมีสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถต่อต้านอนุมูลอิสระได้ และคาดว่าจะนำมาใช้เป็นเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพได้ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพิจารณาฤทธิ์ต้านอนุมูล

อิสระและคุณสมบัติทางเคมีของกาแฟคอมบูชา การศึกษาครั้งนี้ใช้การออกแบบแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) โดยใช้ปัจจัย 2 ประการ ได้แก่ พันธุ์กาแฟ (อาราบิก้า โรบัสต้า ลิเบอริก้า) และความเข้มข้นของกาแฟ (2.5 กรัม/น้ำ 250 มิลลิลิตร 5 กรัม/น้ำ 250 มิลลิลิตร และ 7.5 กรัม/น้ำ 250 มิลลิลิตร) กาแฟคอมบูชาที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดใช้กาแฟลิเบอริก้า 2.5 กรัม/น้ำ 250 มิลลิลิตร ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงถึง 74.86 เปอร์เซ็นต์ ของ Radical Scavenging Activity DPPH มีน้ำตาล 10.02 เปอร์เซ็นต์ ค่า pH 3.14 กรดรวม 0.56 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณฟีนอลิกรวม 9.10 มิลลิกรัม GAE/กรัม และแทนนิน 0.04 เปอร์เซ็นต์ คอมบูชาผสมกาแฟลิเบอริก้ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด อย่างไรก็ตาม กาแฟมีทั้งชนิดที่มีคาเฟอีนและไม่มีคาเฟอีน ซึ่งอาจส่งผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ การสร้างสารออกฤทธิ์ และคุณสมบัติทางเคมีของคอมบูชาแตกต่างกัน งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของชนิดของกาแฟ (มีคาเฟอีนและไม่มีคาเฟอีน) ต่อคุณสมบัติทางเคมี ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณจุลินทรีย์ของคอมบูชาที่ผลิตขึ้น โดยเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงในระหว่างกระบวนการหมัก เพื่อประเมินศักยภาพในการใช้กาแฟทั้งสองชนิดเป็นวัตถุดิบในการผลิตคอมบูชาที่มีคุณภาพและเป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การผลิตเครื่องดื่มคอมบูชากาแฟมีคาเฟอีนและไม่มีคาเฟอีน

นำกาแฟบดสายพันธุ์อาราบิก้า (กาแฟที่มีคาเฟอีนและไม่มีคาเฟอีน) (ยี่ห้อ Boncafe) มาละลายในน้ำร้อน (น้ำ Reverse Osmosis, R.O.) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร สกัดที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมน้ำตาลทราย 200 กรัม เมื่อน้ำตาลละลายเติมน้ำอีก 1,500 มิลลิลิตร กรองน้ำกาแฟที่มีคาเฟอีนและไม่มีคาเฟอีนด้วยผ้าขาวบาง และเทใส่ขวดโหลที่เตรียมไว้ รอให้น้ำกาแฟอุ่น ที่อุณหภูมิประมาณ 35 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมแผ่นจุลินทรีย์รวมอาศัยของแบคทีเรียและยีสต์ 100 กรัม ลงไปปิดปากขวดโหลด้วยผ้าขาวบาง หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 วัน

2. การวิเคราะห์ผลทางเคมี

2.1 วัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ ($^{\circ}$ Brix) โดยใช้เครื่อง Refractometer

2.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโทสและกรดอะซิติกด้วยเครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC-RID) ยี่ห้อ Shimadzu แสดงผลเป็นเปอร์เซ็นต์เทียบกับกราฟสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโทสและกรดอะซิติก นำตัวอย่างมากรองด้วย Syringe filter ขนาด 0.45 ไมครอน แล้วจึงนำตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร เพื่อใช้ในการวิเคราะห์โดยใช้สภาวะในการวิเคราะห์ ดังนี้

1) อุณหภูมิคอลัมน์ 45 องศาเซลเซียส

2) คอลัมน์ HPX-87H

3) ตรวจวัดแบบ reflective index detector (RID-10A)/Degrasser DGU-20As/PumpLC-20AD/Auto sampler sil-20A/column oven CTO-20A

4) เฟสเคลื่อนที่สำหรับการวิเคราะห์ คือ กรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.005 โมลต่อลิตร

5) อัตราการไหล 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที

6) ปริมาณการฉีด 20 ไมโครลิตร

การเตรียมเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) เตรียม 2 ลิตร ใช้กรดซัลฟิวริก 0.6 มิลลิลิตร ปรับด้วยน้ำปราศจากไอออน (deionized water) ในขวดปริมาตร (volumetric flask) นำสารไปกรองผ่านกระดาษกรอง 0.45 ไมครอน โดยใช้ชุดกรอง millipore แล้ว ผ่านคลื่นเสียงความถี่สูง (Sonicate) สารเป็นเวลาครึ่งชั่วโมง (Aguiar et al., 2005)

2.3 ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของคอมบูชาด้วยวิธี DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

เอาตัวอย่างคอมบูชา 5 มิลลิลิตรลงในบีกเกอร์ ขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 20 นาทีที่อุณหภูมิห้อง สารละลายเอทานอล 95% เป็น Blank วัดการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ Shimadzu UV-1700 คำนวณผลเป็นมิลลิกรัมของกรดแอสคอร์บิก/มิลลิลิตร (Brand-Williams et al., 1995)

2.4 การวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

เอาตัวอย่างคอมบูชา 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองและเติมน้ำกลั่น 9.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Folin-ciocateau ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เติมสารละลาย Na_2CO_3 เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 756 นาโนเมตร วิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดจากกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก (มิลลิกรัมของกรดแกลลิก/ลิตร) (Singleton et al., 1999)

2.5 การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม

เอาตัวอย่างคอมบูชา 1 มิลลิลิตร ปรับด้วยเอทานอล ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมสาร NaNO_2 ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 5 นาที เติม AlCl_3 ความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 6 นาที เติมสาร NaOH ความเข้มข้น 1 โมลต่อลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรทั้งหมดให้ได้ 10 มิลลิลิตรด้วยเอทานอล ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 นาโนเมตร วิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์รวมจากกราฟมาตรฐานสารรูทีน (ไมโครกรัมของรูทีน/มิลลิลิตร) (Liu et al., 2017)

2.6 การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่ได้จากการทดลองวิเคราะห์โดยใช้ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน การทดลองดำเนินการตามแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) การวิเคราะห์ทางสถิติใช้การทดสอบค่าที่แบบอิสระ (Independent sample t-test) โดยกำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ $p \leq 0.05$ ในทุกกรณี ใช้โปรแกรม SPSS version 22.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) ในการวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. คุณสมบัติทางเคมีของคอมบูชากาแฟ โดยใช้กาแฟมีคาเฟอีนและไม่มีความคาเฟอีน ในระหว่างกระบวนการหมัก

1.1 ปริมาณของแข็งที่ละลายได้

ปริมาณของแข็งที่ละลายทั้งหมดในวันที่ 0 ของกระบวนการหมักคอมบูชากาแฟมีคาเฟอีนมีค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้เท่ากับ 6.50 ± 0.71 องศาบริกซ์ และคอมบูชากาแฟไม่มีคาเฟอีนมีค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้เท่ากับ 6.50 ± 0.00 องศาบริกซ์ หลังจากเริ่มกระบวนการหมักคอมบูชาปริมาณของแข็งที่ละลายได้มีแนวโน้มที่ลดลงตามระยะเวลาของกระบวนการหมัก ในวันที่ 12 ของกระบวนการหมัก คอมบูชากาแฟมีคาเฟอีนมีค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้เท่ากับ 6.80 ± 0.00 องศาบริกซ์ แต่ในคอมบูชากาแฟไม่มีคาเฟอีนมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้จะลดลงในช่วงแรกและจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นวันที่ 9 และลดลงวันที่ 12 คอมบูชากาแฟไม่มีคาเฟอีนมีค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้เท่ากับ 6.10 ± 0.14 องศาบริกซ์ (ตารางที่ 1) งานวิจัยของ Johanna (2021) ได้ทำการหมักคอมบูชาจากชาดำเป็นเวลา 21 วัน ด้วยอุณหภูมิที่แตกต่างกัน โดยปริมาณของแข็งที่ละลายได้ของคอมบูชาที่หมักด้วยอุณหภูมิ 35.9 องศาเซลเซียส ในช่วงต้นของกระบวนการหมักปริมาณของแข็งที่ละลายได้เริ่มเพิ่มขึ้นและยังคงดำเนินต่อไปให้ทำตลอดระยะเวลาการหมักด้วยความเร็วที่เพิ่มขึ้นอย่างมาก วันสุดท้ายของการหมักค่าสุดท้ายคือ 7.2 องศาบริกซ์ จากการศึกษาการหมักคอมบูชาจากเปลือกกาแฟที่มาจากประเทศบราซิลเป็นเวลา 9 วัน พบว่า ในวันที่ 9 ปริมาณของแข็งที่ละลายได้มีค่าลดลง เท่ากับ 10.0 ± 0.42 องศาบริกซ์

ตารางที่ 1 ปริมาณของแข็งที่ละลายได้จากกระบวนการหมักคอมบูชากาแฟ โดยใช้กาแฟมีคาเฟอีนและไม่มีคาเฟอีน

ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (องศาบริกซ์) : $\bar{X} \pm S.D$		
วันที่หมัก	คอมบูชากาแฟมีคาเฟอีน	คอมบูชากาแฟไม่มีคาเฟอีน
วันที่ 0	6.50±0.71 ^a	6.50±0.00 ^a
วันที่ 3	7.00±0.00 ^a	6.20±0.00 ^b
วันที่ 6	7.00±0.00 ^a	5.50±0.71 ^b
วันที่ 9	6.80±0.00 ^a	6.05±0.07 ^b
วันที่ 12	6.80±0.00 ^a	6.10±0.14 ^b

หมายเหตุ : a,b คือข้อมูลที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวนอนเดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

1.2 ปริมาณน้ำตาลฟรุกโตส

จากการทดลองวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลฟรุกโตส ของคอมบูชากาแฟมีคาเฟอีนและไม่มีคาเฟอีนซึ่งได้ติดตามการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ น้ำตาลฟรุกโตสในกระบวนการหมักทุก ๆ 3 วัน ในระหว่างวันที่ 0 - 12 มีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ น้ำตาลฟรุกโตส พบว่าคอมบูชากาแฟมีคาเฟอีนในช่วงแรกของกระบวนการหมักมีการเพิ่มของปริมาณน้ำตาลฟรุกโตสเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ในวันที่ 3 และลดลง ในวันที่ 6 มีค่าปริมาณน้ำตาลฟรุกโตสต่ำสุดในวันที่ 12 เท่ากับ 4.98 ± 0.18 เปอร์เซ็นต์ และคอมบูชากาแฟไม่มีคาเฟอีนมีการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลฟรุกโตสคล้ายคลึงกับคอมบูชากาแฟมีคาเฟอีนและมีค่าปริมาณน้ำตาลฟรุกโตสสูงสุดในวันที่ 12 เท่ากับ 5.41 ± 0.06 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2) งานวิจัยของ Gaggia et al., (2018) ได้ทำการหมักคอมบูชากาแฟจากชาดำ ชาเขียว และชาออยบอส พบว่าปริมาณน้ำตาลฟรุกโตสในระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชาวันที่ 7 และ 14 มีปริมาณของน้ำตาลฟรุกโตสที่เพิ่มขึ้น โดยที่คอมบูชาจากชาออยบอสมีปริมาณ น้ำตาลฟรุกโตสในวันที่ 7 และ 14 เท่ากับ 4.07 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 8.83 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร ตามลำดับ จากงานวิจัยของ นิสารัมสัมช่า และคณะ (2563) ได้ศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพของผลิตภัณฑ์คอมบูชาที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก พบว่าน้ำตาลทรายในคอมบูชาจะถูกไฮโดรไลซ์โดยเอนไซม์อินเวอร์เทสจากยีสต์ ยีสต์จะใช้น้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตสทำให้ยีสต์เพิ่มปริมาณและผลิตเอทานอล แบคทีเรียผลิตกรดอะซิติกเปลี่ยนกลูโคสให้เป็นกรดกลูโคนิกและเปลี่ยนฟรุกโตสให้เป็นกรดอะซิติก ปริมาณน้ำตาลที่เหลือมากอาจทำให้รสชาติหวานเกินและลดคุณค่าทางสุขภาพ ในทางกลับกันค่าปริมาณน้ำตาลลดลงเหลือน้อยแสดงว่าการหมักสมบูรณ์ทำให้มีรสชาติที่พอดี

ตารางที่ 2 ปริมาณฟรุกโตสจากกระบวนการหมักคอมบูชากาแฟ โดยใช้กาแฟมีคาเฟอีนและไม่มีคาเฟอีน

ปริมาณน้ำตาลฟรุกโตส (เปอร์เซ็นต์) : $\bar{X} \pm S.D$		
วันที่หมัก	คอมบูชากาแฟมีคาเฟอีน	คอมบูชากาแฟไม่มีคาเฟอีน
วันที่ 0	5.03±0.40 ^a	5.00±0.22 ^b
วันที่ 3	6.97±2.57 ^a	5.20±0.06 ^b
วันที่ 6	5.18±0.14 ^a	4.96±0.85 ^b
วันที่ 9	5.28±0.05 ^a	4.73±0.48 ^b
วันที่ 12	4.98±0.18 ^b	5.41±0.06 ^a

หมายเหตุ : a,b คือข้อมูลที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวนอนเดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

1.3 ปริมาณน้ำตาลกลูโคส

จากการทดลองวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคส ของคอมบูชากาแฟมีคาเฟอีนและกาแฟไม่มีคาเฟอีนซึ่งได้ทำการติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลกลูโคสในกระบวนการหมักทุก ๆ 3 วัน ในระหว่างวันที่ 0-12 มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลกลูโคส พบว่าคอมบูชากาแฟมีคาเฟอีนมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสเพิ่มขึ้นในช่วงแรกของกระบวนการหมัก และลดลงตั้งแต่วันที่ 6-12 มีค่าเท่ากับ 5.13 ± 0.33 เปอร์เซ็นต์และคอมบูชากาแฟไม่มีคาเฟอีน มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสเพิ่มขึ้นในช่วงแรกและลดลงในวันที่ 6 ของกระบวนการหมักมีค่าสูงสุดในวันที่ 12 เท่ากับ 5.27 ± 0.16 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3) งานวิจัยของ Gaggia et al., (2018) ได้ทำการหมักคอมบูชาจากชาดำ ชาเขียว และชาออยบอส พบว่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสในระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชาวันที่ 7 และ 14 มีปริมาณของน้ำตาลกลูโคสที่เพิ่มขึ้น โดยที่คอมบูชาจากชาออยบอสมีปริมาณน้ำตาลกลูโคส ในวันที่ 7 และ 14 เท่ากับ 8.60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 18.10 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ตารางที่ 3 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากกระบวนการหมักคอมบูชากาแฟ โดยใช้กาแฟมีคาเฟอีนและไม่มีคาเฟอีน

ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (เปอร์เซ็นต์) : $\bar{X} \pm S.D$		
วันที่หมัก	คอมบูชากาแฟมีคาเฟอีน	คอมบูชากาแฟไม่มีคาเฟอีน
วันที่ 0	6.11 ± 0.04^a	4.99 ± 0.14^b
วันที่ 3	7.02 ± 2.46^a	5.25 ± 0.10^b
วันที่ 6	5.43 ± 0.03^a	4.94 ± 0.74^b
วันที่ 9	5.33 ± 0.13^a	4.90 ± 0.53^b
วันที่ 12	5.13 ± 0.33^b	5.27 ± 0.16^a

หมายเหตุ : a,b คือข้อมูลที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวนอนเดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

1.4 ปริมาณกรดอะซิติก

จากการทดลองวิเคราะห์ปริมาณกรดอะซิติก ของคอมบูชากาแฟมีคาเฟอีนและกาแฟไม่มีคาเฟอีน พบว่าคอมบูชากาแฟมีคาเฟอีน มีปริมาณกรดอะซิติกสูงสุดในวันที่ 12 มีค่า 1.20 ± 0.17 เปอร์เซ็นต์ และคอมบูชากาแฟไม่มีคาเฟอีนมีปริมาณกรดอะซิติกสูงสุดใน วันที่ 12 มีค่าเท่ากับ 2.73 ± 0.07 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งปริมาณกรดอะซิติกจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของกระบวนการหมัก ยิ่งระยะเวลาของกระบวนการหมักนานความเข้มข้นของกรดอะซิติกจะยิ่งสูงขึ้น (ตารางที่ 4) งานวิจัยของ วิลาวัลย์ บุญยสุภา และคณะ (2566) เมื่อทำการหมักคอมบูชาใช้เวลา 9 วัน โดยใช้แหล่งวัตถุดิบที่แตกต่างกัน ได้แก่ ดอกอัญชัน และดอกลาเวนเดอร์ พบว่าคอมบูชาที่ใช้ดอกอัญชันมีปริมาณกรดอะซิติกสูงกว่าคอมบูชาที่ใช้ดอกลาเวนเดอร์ มีค่าเท่ากับ 0.29 เปอร์เซ็นต์และ 0.24 เปอร์เซ็นต์ ค่ากรดอะซิติกที่สูงเป็นสารเมตาบอไลต์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดอะซิติกซึ่งมีบทบาทสำคัญในการหมักคอมบูชา

ตารางที่ 4 ปริมาณกรดอะซิติกจากกระบวนการหมักคอมบูชากาแฟ โดยใช้กาแฟมีคาเฟอีนและไม่มีคาเฟอีน

ปริมาณกรดอะซิติก (เปอร์เซ็นต์) : $\bar{X} \pm S.D$		
วันที่หมัก	คอมบูชากาแฟมีคาเฟอีน	คอมบูชากาแฟไม่มีคาเฟอีน
วันที่ 0	0.00 ± 0.00^a	0.00 ± 0.00^a
วันที่ 3	0.00 ± 0.00^b	0.08 ± 0.00^a
วันที่ 6	0.65 ± 0.02^b	0.87 ± 0.04^a
วันที่ 9	0.52 ± 0.02^b	0.81 ± 0.05^a
วันที่ 12	1.20 ± 0.17^b	2.73 ± 0.07^a

หมายเหตุ : a,b คือข้อมูลที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวนอนเดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

1.5 การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมและปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ของคอมบูชาจากคอมบูชากาแฟมีคาเฟอีนและกาแฟไม่มีคาเฟอีน

คอมบูชากาแฟมีคาเฟอีนมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมและปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุดเท่ากับ 27.25 ± 0.24 มิลลิกรัมของกรดแอสคอร์บิกต่อมิลลิลิตร 759.86 ± 9.09 ไมโครกรัมรูทีนต่อมิลลิลิตร 2134.78 ± 4.99 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อลิตรตามลำดับ (ตารางที่ 5) งานวิจัยของ Nasution et al., (2024) ทำการทดลองหมักคอมบูชาจากเปลือกกาแฟพันธุ์โรบัสต้าเป็นเวลา 21 วัน พบกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมและ ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 159.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 1.90 มิลลิกรัมเคอซิทินต่อมิลลิลิตร และ 112.59 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ตารางที่ 5 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมและปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของคอมบูชากาแฟมีคาเฟอีนและกาแฟไม่มีคาเฟอีน

คอมบูชา	ค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (มิลลิกรัมของกรดแอสคอร์บิกต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวม ไมโครกรัมรูทีนต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด (มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อลิตร)
กาแฟมีคาเฟอีน	27.25 ± 0.24^a	759.86 ± 9.09^a	2134.78 ± 4.99^a
กาแฟไม่มีคาเฟอีน	23.67 ± 0.35^b	545.57 ± 1.01^b	1662.12 ± 5.41^b

หมายเหตุ : a,b คือข้อมูลที่มีตัวอักษรต่างกันในกลุ่มเดียวกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

2. ปริมาณจุลินทรีย์ของคอมบูชากาแฟ โดยใช้กาแฟมีคาเฟอีนและไม่มีคาเฟอีน

2.1 ปริมาณจุลินทรีย์

พบว่าคอมบูชากาแฟมีคาเฟอีนปริมาณแบคทีเรีย ในกระบวนการหมักวันที่ 0 เท่ากับ 3.95×10^9 CFU/ml และในวันที่ 12 มีปริมาณแบคทีเรียเท่ากับ 4.85×10^{15} CFU/ml ส่วนคอมบูชากาแฟไม่มีคาเฟอีนมีปริมาณแบคทีเรียในกระบวนการหมักวันที่ 0 เท่ากับ 4.10×10^{11} CFU/ml และในวันที่ 12 มีปริมาณแบคทีเรียเท่ากับ 4.35×10^{16} CFU/ml (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 ปริมาณแบคทีเรีย และยีสต์ รา ของคอมบูชากาแฟมีคาเฟอีนและไม่มีคาเฟอีน

คอมบูชา	วันที่	คอมบูชากาแฟมีคาเฟอีน	คอมบูชากาแฟไม่มีคาเฟอีน
ปริมาณแบคทีเรีย (CFU/ml)	0	3.95×10^{8b}	4.10×10^{10a}
	12	4.85×10^{14b}	4.35×10^{15a}
ปริมาณยีสต์ รา (CFU/ml)	0	3.60×10^{8a}	6.50×10^{7b}
	12	5.50×10^{14a}	5.85×10^{13b}

หมายเหตุ : a,b คือข้อมูลที่มีอักษรกำกับต่างกันในกลุ่มเดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

2.2 ปริมาณยีสต์ รา

พบว่าคอมบูชากาแฟมีคาเฟอีนมีปริมาณยีสต์ รา ในกระบวนการหมักวันที่ 0 เท่ากับ 3.60×10^9 CFU/ml และในวันที่ 12 มีปริมาณยีสต์ รา 5.50×10^{15} CFU/ml ส่วนคอมบูชากาแฟไม่มีคาเฟอีนมีปริมาณยีสต์ ราในกระบวนการหมักวันที่ 0

เท่ากับ 6.50×10^8 CFU/ml และในวันที่ 12 มีปริมาณยีสต์ รา เท่ากับ 5.85×10^{14} CFU/ml (ตารางที่ 6) จากงานวิจัยของ Jayabalan et al., (2024) ได้ทำการศึกษาปริมาณจุลินทรีย์ในคอมบูชา พบว่าจุลินทรีย์ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 10^5 - 10^7 CFU/ml จากการทดลองหมักคอมบูชาจากแฟมีคาเฟอีนและไม่มีคาเฟอีนมีค่าปริมาณจุลินทรีย์ที่สูงกว่าเกณฑ์ที่กำหนด ซึ่งส่งผลให้มีรสชาติเปรี้ยวจัดและกลิ่นแรงมากเกินไป

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

คอมบูชาจากกาแฟมีคาเฟอีนมีปริมาณน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตสและกรดอะซิติกน้อยกว่าคอมบูชาจากกาแฟไม่มีคาเฟอีน มีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและปริมาณแบคทีเรียในวันที่ 12 ของการหมักสูงกว่าคอมบูชาจากกาแฟไม่มีคาเฟอีน จากการทดลองนี้จะเห็นได้ว่าคอมบูชาจากกาแฟมีคาเฟอีนเหมาะสมในการผลิตคอมบูชาเพื่อสุขภาพ เนื่องจากมีสารออกฤทธิ์ในปริมาณที่สูงเมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน จึงสามารถบ่งชี้ได้ถึงการนำมาผลิตเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพของผู้บริโภคได้ สามารถนำมาผลิตเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพใหม่ๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพได้

อย่างไรก็ตามการศึกษาคอมบูชาที่ทำจากคอมบูชาจากกาแฟมีคาเฟอีนยังมีรายงานไม่มากนัก ควรทำการวิจัยเพิ่มเติมกับกาแฟสายพันธุ์อื่นเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบ นอกจากนี้ควรหาค่าประกอบอื่นๆ เช่น การตรวจสอบสารอาหาร เพื่อใช้ในเชิงเศรษฐกิจต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์วิทยาศาสตร์และคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม และศูนย์เครื่องมือกลาง มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่และสารเคมีในการวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- นิสา ร่มสัมช่า, จุฑามาศ พรสันเทียะ, ทิพย์วรินทร์ รีมลาดวน และกนกทิภา เวชกลาง. (2564). คุณสมบัติทางชีวภาพของผลิตภัณฑ์คอมบูชาที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก. *วารสารนเรศวรพะเยา*, 14(1), 1–12.
- นันทน์ภัส พิสิษฐ์อาภาภัก และศุภาพิชญ์ ทองรัตน์. (2563). *การพัฒนาเครื่องดื่มชาหมักจากใบองุ่นที่มีสารต้านอนุมูลอิสระสูง, โครงการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร.*
- ปิยวรรณ พันสี, ศิรประภา รักษาภักดี และกัลย์สุดา ดวงศรีแก้ว. (2567). การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสับฐานสกัดจากกาแฟและสับฐานสกัดจากกาแฟผสมสารสกัดใบหม่อน. *Science and Engineering Connect*, 47(1), 26–41.
- วิลาวัลย์ บุญยสุภา, วรรณิการ์ ทองดอนเปรี้ยง, ชลธิชา ศรีจันทร์, จิตาธร แพงทอง และกิตติพัฒน์ อารีเอื้อ. (2566). การเปรียบเทียบคุณสมบัติทางเคมี ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและ การทดสอบทางประสาทสัมผัสของคอมบูชาจากดอกอัญชันและลาเวนเดอร์. *วารสารวิทยาศาสตร์ วิศวกรรมศาสตร์ และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม*. 2(2), 27-35.
- Aguiar, A., Nascimento, R.A.D.A., Ferretti, L.P., & Goncalves, A.R. (2005). Determination of organic acids and ethanol in commercial vinegars. *Brazilian Journal of Food Technology*, 5(SIPAL Macro), 51–56.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28, 25-30.

- Giggia, F., Baffoni, L., Galiano, M., Nielsen, D.S., Jakosen, R.R., Castro-Mejia, J.L., Bosi, S., Truzzi, F., Musumeci, F., Dinelli, G., & Gioia, D.D. (2018). Kombucha beverage from green, black and rooibos teas: a comparative study looking at microbiology, chemistry and antioxidant activity. *Nutrients*, 11, 1. <https://doi.org/10.3390/nu11010001>
- Jayabalan, R., Malbaša, R.V., Lončar, E.S., Vitas, J.S., & Sathishkumar, M. (2014). A review on kombucha tea—microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. *comprehensive reviews in food science and food safety. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4), 538–550. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12073>
- Johanna, F. (2021). *The effect of temperature and fungal-bacterial ratio in kombucha culture fermentation* [Unpublished bachelor's thesis]. Department of food technology, engineering and nutrition, Lund university.
- Karyantina, M., Surulloh, A., & Suhartatik, N. (2024). Antioxidant activity kombucha coffee (Coffee spp) with variation concentration and type, *BIO Web of Conferences*, 99, 02009. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20249902009>
- Liu, H., Song, Y., & Zhang, X. (2017). Determination of total flavonoids in Leek by $AlCl_3$ colorimetric assay. *Chemical Engineering Transactions*, 59, 775–780. <https://doi.org/10.3303/CET1759130>
- Nasution, L.R., Permata, Y.M., Keliat, J.M., Pelawi, M.A., Ciunardy, V.K., & Seruni, T.R. (2024). Fermentation effects on caffeine content and chemical parameters of kombucha coffee cascara. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 16(4), 11-16.
- Sales, A.L., Cunha, S.C., Morgado, J., Cruz, A., Santos, T.F., Ferreira, I.M.P.L.V.O., Fernandes, J.O., Miguel, M.A.L., & Farah. (2023). A. volatile, microbial, and sensory profiles and consumer acceptance of coffee cascara kombuchas. *Foods*, 12, 2710. <https://doi.org/10.3390/foods12142710>
- Singleton, V.L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. In: *Methods Enzymol.* Academic Press, 152-178.