บทความวิจัย (Research Article)

คุณสมบัติทางชีวภาพของผลิตภัณฑ์คอมบูชาที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก

นิสา ร่มส้มซ่า[1*], จุฑามาศ พรสันเทียะ[1], ทิพย์วรินทร์ ริมลำดวน[1] และ กุณฑิกา เวชกลาง[1]

The biological activities of Kombucha during Fermentation Process

Nisa Romsomsa[1*], Juthamat Pornsanthia[1], Thipwarin Rimlumduan[1] and Kunthika Vechklang[1]

[1] Department of Applied Biology, Faculty of Sciences and Liberal Arts, Rajamangala University of Technology Isan Nakhonratchasima, Nakhonratchasima 30000

* Correspondence to: nisa_romsomsa@hotmail.com

Naresuan Phayao J. 2020;14(1)**:** 75-87.

Received; 5 October 2020; Revised: 6 January 2021; Accepted: 19 April 2021

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพของคอมบูชาที่ได้จากกระบวนการหมัก โดย ทำการทดสอบคุณสมบัติทางชีวภาพที่มีประโยชน์ในผลิตภัณฑ์คอมบูชา ได้แก่ ปริมาณแบคทีเรียกรดอะซิติกและยีสต์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณฟีนอลิครวม และฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย ทำการทดสอบในระหว่างการหมักคอมบูชาตั้งแต่เริ่มกระบวนการหมักถึงวันที่ 14 ของการหมัก พบว่ายีสต์และแบคทีเรียกรดอะซิติกมีปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมักโดยยีสต์มีปริมาณสูงสุด เท่ากับ 5.44±0.09 log CFU/mL ในวันที่ 10 ของการหมัก ในขณะที่ปริมาณแบคทีเรียกรดอะซิติกมีปริมาณเท่ากับ 5.27±0.05 log CFU/mL ในวันที่ 14 ของการหมัก กรดอะซิติกมีปริมาณที่เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการหมักโดยมีปริมาณ 0.74±0.03 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร และพีเอชมีค่าที่ลดลงเท่ากับ 3.14 ร่วมกับพบปริมาณแอลกอฮอล์เท่ากับร้อยละ 0.5 โดยปริมาตรในวันที่ 14 ของการหมัก นอกจากนี้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 6.57±0.012 กรัมต่อลิตรในวันเดียวกัน ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *Salmonella* sp., *Stayphylococcus aureus และ Escherichia coli* ด้วยวิธี Agar well diffusion พบว่าตัวอย่างคอมบูชามีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียเพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาการหมัก โดยตัวอย่างคอมบูชาในวันที่ 14 ของการหมัก มีค่าดัชนีการยับยั้งแบคทีเรีย (Antibacterial index, AI) เท่ากับ 0.93±0.10 1.49±0.17 1.30±0.10 0.98±0.10 และ 1.12±0.24 ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่าค่าร้อยละ Scavenging activity เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมัก โดยมีค่าร้อยละ Scavenging activity เท่ากับ 57.31±0.66 เปอร์เซ็นต์ (เทียบกับ ascorbic acid 254.99 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ในวันที่ 14 ของการหมัก ขณะที่การวิเคราะห์ด้วยวิธี ABTS ในตัวอย่างวันเดียวกันพบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 15.66±0.15 มิลลิโมลลาร์เทียบกับสารละลายโทรล็อก นอกจากนี้ยังพบปริมาณฟีนอลิกรวม เท่ากับ 0.99±0.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักคอมบูชาที่มีคุณสมบัติทางชีวภาพที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพโดยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมักเมื่อเทียบกับชาดำ

คำสำคัญ: คอมบูชา, ยีสต์, แบคทีเรียกรดอะซิติก, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย

---

[1] สาขาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และศิลปศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน นครราชสีมา จังหวัดนครราชสีมา 30000

Abstract

Aim of this research is to evaluate the biological activities of Kombucha during fermentation process and determined potential benefits of kombucha product, including the viable counts of acetic acid bacteria and yeasts, antioxidant activity, total phenolic contents and antibacterial activity were investigated. The brewing kombucha for 14 days was studied. The results show that yeast cells drastically increased withthin 10 days lead to the growth of 5.40±0.09 log CFU/mL while acetic acid bacteria increased of 5.27±0.05 log CFU/mL withthin 14 days was observed. According to acetic acid production has increased to 0.74±0.03 g/100 mL and reduces the pH at 3.14. The ethanol content of the kombucha was 0.5 % by volume and reducing sugar of 6.57±0.01 g/L was found. Antibacterial activity of kombucha in during fermentation process was determined which against *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *Salmonella* sp., *Stayphylococcus aureus* and *Escherichia coli* by agar well diffusion method. 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 0.93±0.10, 1.49±0.17, 1.30±0.10, 0.98±0.10 and 1.12±0.24, respectively. The antioxidant activity was determined using the DPPH and ABTS methods. Kombucha samples exhibited increasing antioxidant activity during in the fermentation process. The 14 days of kombucha sample showed highest antioxidant activity by inhibiting 57.31±0.66 % of DPPH (equivalent to ascorbic acid 254.99 μg/mL) and showed 15.66±0.15 mM Trolox Equivalent Antioxidative Capacity for ABTS assay. Remarkable high phenolic content was found in 14 days kombucha brewing 0.99±0.04 mg gallic acid equivalents per milliliter. The result of present study revealed that kombucha could be the potential health benefit as antioxidant and antimicrobial activities which were increased with time of fermentation and demonstrated a higher activity compared to black tea.

Keywords: Kombucha, Yeast, Acetic acid bacteria, Antioxidant activity, Antibacterial activity

บทนำ

สภาพสังคมปัจจุบันมีความเปลี่ยนแปลงในลักษณะเป็นสังคมที่เร่งรีบในการทำงานและการดำเนินชีวิตประจำวัน รวมถึงสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปส่งผลให้ผู้คนนิยมหันมาดูแลสุขภาพกันมากขึ้น ดังนั้นความต้องการผลิตภัณฑ์ที่ช่วยเสริมสร้างสุขภาพให้ร่างกายมีระบบภูมิคุ้มกันที่แข็งแรงจึงมีแนวโน้มมากขึ้น โดยปัจจุบันผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพได้ถูกพัฒนาขึ้นอย่างแพร่หลายในด้านวัตถุดิบจากธรรมชาติ กระบวนการผลิต รูปแบบและรสชาติของผลิตภัณฑ์ เพื่อตอบสนองความต้องการของผู้บริโภค นอกจากอาหารเพื่อสุขภาพแล้วความต้องการผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มเพื่อสุขภาพมีแนวโน้มสูงขึ้น ซึ่งผู้บริโภคหันมาให้ความสนใจรับประทานเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพจากธรรมชาติมากขึ้นโดยเฉพาะเครื่องดื่มที่มีสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) การต้านเชื้อจุลินทรีย์ (Antimicrobial activity) ต้านการอักเสบ รวมไปถึงเป็นสารต้านการก่อมะเร็ง [1]

ชาหมัก หรือ Kombucha คือเครื่องดื่มที่นำเอาใบชาดำ ชาเขียว หรือใบชาอื่นๆ มาหมักกับน้ำตาลและหัวเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast หรือเรียกว่า“SCOBY” เกิดเป็นเซลลูโลสที่มีลักษณะคล้ายเยลลี่อยู่ด้านบน เพื่อให้เกิดกระบวนการหมักชาอย่างน้อย 1 สัปดาห์ จนออกมาเป็นเครื่องดื่มที่มีรสชาติหวานอมเปรี้ยว มีกลิ่นแอลกอฮอล์เล็กน้อย เนื่องจากส่วนผสมหลักเป็นกรดน้ำส้ม (Acetic Acid) ประโยชน์ของเครื่องดื่มชาหมักช่วยส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกัน เนื่องจากมีสารต้านอนุมูลอิสระในปริมาณที่สูง มีจุลินทรีย์ที่เป็นโปรไบโอติกส์ (Probiotics) เนื่องด้วย

ชาหมักมีกรดน้ำส้มหรือกรดอะซิติกเป็นส่วนประกอบหลัก จึงมีคุณสมบัติช่วยกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นอันตรายต่อร่างกาย นอกจากนี้คุณสมบัติของชาหมักยังช่วยลดความเสี่ยงโรคหัวใจและหลอดเลือดลดความเสี่ยงโรคมะเร็ง ลดระดับน้ำตาลในเลือด เป็นต้น [2-4] ดังนั้นการศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักคอมบูชาที่เป็นประโยชน์ของผลิตภัณฑ์คอมบูชา ทำให้ทราบถึงระยะเวลาที่เหมาะสมในการหมักคอมบูชาเพื่อให้ได้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูงสุด จะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่เป็นประโยชน์สำหรับเป็นแนวทางศึกษาการพัฒนาเครื่องดื่มคอมบูชาเพื่อสุขภาพให้เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคต่อไป

วัสดุและวิธีการ

การหมักคอมบูชา

ต้มน้ำปริมาตร 3 ลิตร ให้เดือดแล้วยกลงจากเตา จากนั้นเติมน้ำตาลทราย 165 กรัม คนจนน้ำตาลละลายแล้วใส่ชาดำทางการค้า 12 กรัม ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที จากนั้นใส่หัวเชื้อคอมบูชาทางการค้า (Scoby) ปริมาณร้อยละ 20 (v/v) ปิดฝาโหลด้วยผ้าขาวบางมัดด้วยยาง บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นระยะเวลา 14 วัน จากนั้นนำมากรองแล้วบรรจุใส่ภาชนะและแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ศึกษาปริมาณแบคทีเรียกรดอะซิติกและยีสต์

ศึกษาปริมาณของเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกและยีสต์ ปริมาณกรดอะซิติก ค่าพีเอช ปริมาณแอลกอฮอล์และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากตัวอย่างคอมบูชาที่ระยะเวลาตั้งแต่วันเริ่มต้นของการหมัก(0) 3 7 10 และ 14 วัน โดยวัดปริมาณแบคทีเรียกรดอะซิติกและยีสต์ใช้เทคนิค 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 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนโคโลนี และมาคำนวณรายงานเป็นค่า log CFU/mL วิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ด้วยเครื่องอีบูลลิโอมิเตอร์ (Ebulliometer) โดยใช้จุดเดือดของน้ำเป็นชุดควบคุม วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี 3, 5 -Dinitrosalicylic Acid (DNS) (Sigma-aldrich, Germany) [5] และวิเคราะห์ปริมาณกรดอะซิติกโดยวิธีการไตเตรต [6]

วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของคอมบูชาด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity

วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต้านอนุมูลอิสระดัดแปลงวิธีของ Lu และคณะ [7] โดยเตรียมสารละลาย 2, 2 diphenyl-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma-aldrich, Germany) ที่ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเจือจางในเอทานอล แล้วนำมาปรับให้มีค่าดูดกลืนแสงที่ 515 นาโนเมตร เท่ากับ 0.9 จากนั้นนำตัวอย่างคอมบูชาที่ระยะเวลาตั้งแต่วันเริ่มต้นของการหมัก(0) 3 7 10 และ 14 วัน มาวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต้านอนุมูลอิสระโดยนำตัวอย่างคอมบูชามาเจือจาง 20 เท่า แล้วปิเปตในปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติมลงในสารละลาย DPPH ที่มีปริมาตร 1.950 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ชุดควบคุมในการทดลองใช้เอทานอล 50 ไมโครลิตร แทนตัวอย่างคอมบูชา เนื่องจากคอมบูชาที่ได้อาจมีสีจึงต้องนำตัวอย่างคอมบูชาที่เจือจางที่ความเข้มข้นดังกล่าวในปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติมลงเอทานอลที่มีปริมาตร 1.950 มิลลิลิตร ไว้สำหรับเป็นหลอดอ้างอิงของตัวอย่างคอมบูชาที่มีสีที่ใช้ในการทดสอบ (BS) มีไว้เพื่อหักออกจากค่าการดูดกลืนแสงของคอมบูชา การทดลองนี้ใช้ Ascorbic acid เป็นสารละลายมาตรฐาน คำนวณหาร้อยละ Scavenging activity จากสมการ

$$\text{ร้อยละ Scavenging activity} = \frac{\left(A_{control} - (A_{sample} - BS)\right)}{A_{control}} \times 100$$

แสดงในหน่วยความเข้มข้นของ Ascorbic Acid เป็นสารมาตรฐาน

วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของคอมบูชาด้วยวิธี ABTS radical scavenging activity

นำตัวอย่างคอมบูชาที่ระยะเวลาตั้งแต่วันเริ่มต้นของการหมัก(0) 3 7 10 และ 14 วัน มาวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต้านอนุมูลอิสระตามวิธีของ Wiriyaphan และคณะ [8] โดยปิเปตตัวอย่างคอมบูชา 20 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับสารละลายอนุมูลอิสระ 2,2′-Azino-bis(3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonic Acid) (ABTS) (Sigma-aldrich, Germany) ปริมาณ 1,980 ไมโครลิตร นำไป Vortex ทิ้งไว้ในที่มืด 5 นาที จากนั้นวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน Trolox (Sigma-aldrich, Germany) ที่ความเข้มข้น 0 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 2.5 มิลลิโมลาร์

การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม

นำตัวอย่างคอมบูชาที่ระยะเวลาตั้งแต่วันเริ่มต้นของการหมัก (0) 3 7 10 และ 14 วัน มาวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวมตามวิธีของ Matthäus และคณะ [9] นำตัวอย่างคอมบูชามาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วนที่เหมาะสม ปิเปตตัวอย่างปริมาตร 50 ไมโครลิตรจากนั้นเติม 2 % Na_2CO_3 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 2 นาที เติม Folin Ciocalteu Reagent (Carlo Erba Chemicals, Italy) (Folin Ciocalteu Reagent: Methanol (RCI Labscan, Ireland) อัตราส่วน 1:1) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่มืด 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำไปคำนวณ หาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดจากกราฟมาตรฐานปริมาณกรดแกลลิก (HiMedia Laboratories, India)

การวิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของคอมบูชา

วิเคราะห์ฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี Agar Well Diffusion ตามวิธีของ Mayo [10] โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar (HiMedia Laboratories, India) ซึ่งใช้เชื้อทดสอบ ได้แก่ *Bacillus subtilis* TISTR 1528, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* TISTR 117 และ *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อทดสอบดังกล่าวในอาหาร LB medium (HiMedia Laboratories, India) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเตรียมสารละลายเซลล์ของเชื้อทดสอบมาปรับปริมาณโดยเทียบกับ McFarland No. 0.5 ซึ่งเท่ากับ 10^7 CFU/mL จากนั้นนำสารละลายเซลล์ของเชื้อทดสอบ Swab เชื้อทดสอบ ลงบนอาหาร LB เจาะหลุมวุ้นด้วย cork borer แล้ว ปิเปตตัวอย่างคอมบูชาที่ระยะเวลาตั้งแต่วันเริ่มต้นของการหมัก(0) 3 7 10 และ 14 วัน ตัวอย่างละ 100 ไมโครลิตร ลงในหลุมอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และคำนวณค่าดัชนีการยับยั้งแบคทีเรีย (Antibacterial index, AI) [11] ดังนี้

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

วิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์ของคอมบูชา

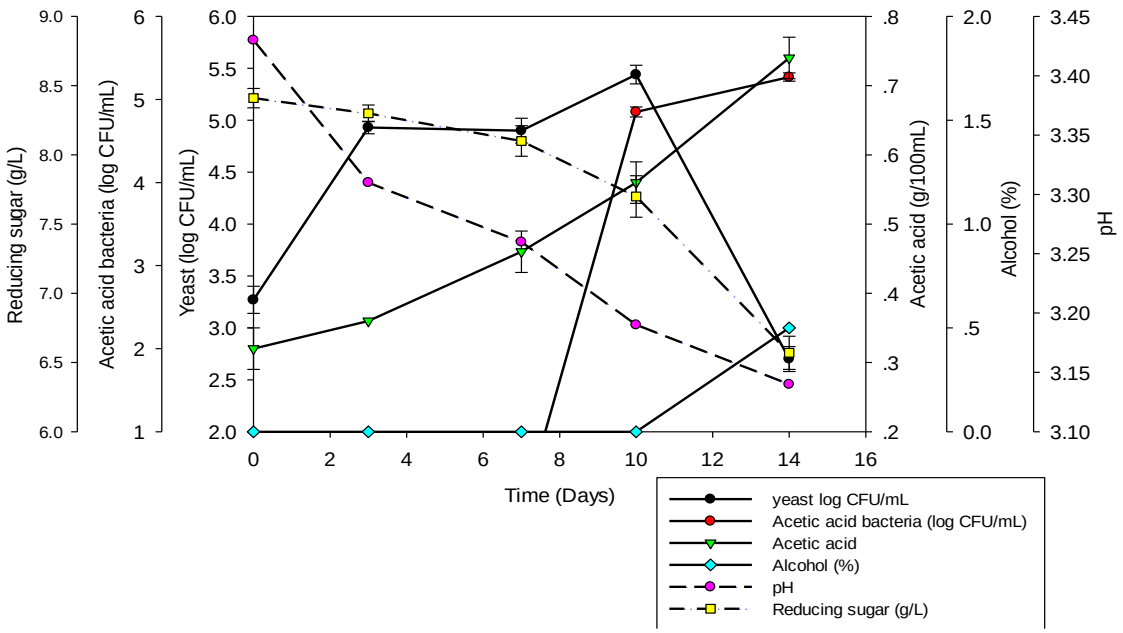
นำตัวอย่างคอมบูชามาวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยาตามเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร ฉบับที่ 3 (2560) ประเภทเครื่องดื่มที่ไม่ได้บรรจุในภาชนะปิดสนิท โดยนำตัวอย่างคอมบูชาปริมาณ 25 มิลลิลิตรมา ตรวจวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอาหารตามวิธี Bacteriological Analytical Manual (BAM) ดังนี้คือ วิเคราะห์เชื้อ *S. aureus* ลงบนอาหาร Baird-Parker agar [12] ตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella sp.* ในอาหาร Lactose broth [13] ตรวจวิเคราะห์เชื้อ *E. coli* โดยวิธี MPN [14] และตรวจวิเคราะห์เชื้อ *B. cereus* ลงบนอาหาร Mannitol-egg yolk-polymyxin (MYP) agar [15]

วิเคราะห์ทางสถิติ

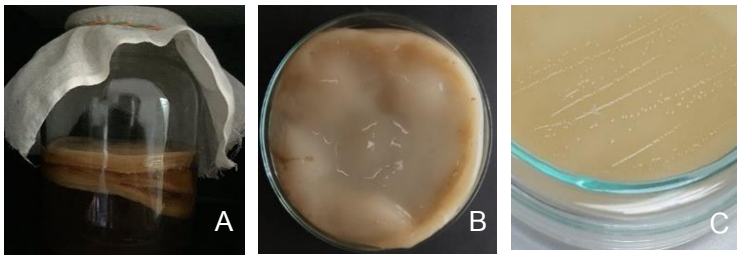
นำข้อมูลมาวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (analysis of variance, ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มโดยใช้ Duncan's multiple range test โดยโปรแกรมวิเคราะห์สถิติ SPSS software program version 12.0

ผลการศึกษา

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียกรดอะซิติกและยีสต์ในกระบวนการหมักชาคอมบูชา แสดงดังภาพ 1 โดยตัวอย่างคอมบูชาในระยะเวลาเริ่มต้นของการหมัก (วันที่ 0) มีปริมาณยีสต์เท่ากับ 3.27±0.13 log CFU/mL และมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเท่ากับ 4.93±0.06 log CFU/mL ในวันที่ 3 และมีปริมาณสูงสุดในวันที่ 10 ของการหมักเท่ากับ 5.44±0.09 log CFU/mL จากนั้นปริมาณยีสต์มีค่าลดลงในวันที่ 14 ของการหมัก โดยมีปริมาณเซลล์เท่ากับ 2.70±0.12 log CFU/mL จากกระบวนการหมักคอมบูชา เกิดสร้างเซลลูโลสสะสมบริเวณผิวหน้าของของคอมบูชา โดยลักษณะของแผ่นเซลลูโลสที่ได้มีลักษณะสีขาวค่อนข้างขุ่น (ภาพ 2A และ2B) ผลการวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียกรดอะซิติกจากแผ่นเซลลูโลสพบแบคทีเรียกรดอะซิติกลักษณะโคโลนีกลมโดยโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ GYC มีการสร้างโซนใสรอบโคโลนี (ภาพ 2C) โดยไม่พบแบคทีเรียกรดอะซิติกตั้งแต่วันเริ่มต้นของการหมัก วันที่ 3 และ 7 แต่ตรวจพบปริมาณแบคทีเรียกรดอะซิติกจากแผ่นเซลลูโลสเท่ากับ 4.85±0.06 log CFU/mL ของการหมักในวันที่ 10 และมีปริมาณเท่ากับ 5.27±0.05 log CFU/mL ในวันที่ 14 ของกระบวนการหมักคอมบูชา ปริมาณกรดอะซิติกในตัวอย่างคอมบูชาเริ่มต้นของการหมักเท่ากับ 0.32±0.03 กรัมต่อตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร และมีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการหมักผ่านไป โดยพบปริมาณกรดอะซิติกสูงสุดในวันที่ 14 ของการหมักเท่ากับ 0.74±0.03 กรัมต่อตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร ซึ่งสอดคล้องกับค่าพีเอช โดยค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 3.43 และมีค่าพีเอชวันที่ 14 ของการหมักเท่ากับ 3.14 ปริมาณแอลกอฮอล์จากตัวอย่างคอมบูชาในวันที่ 14 ของการหมักเท่ากับร้อยละ 0.5 ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของตัวอย่างคอมบูชาเริ่มต้นเท่ากับ 8.41±0.07 กรัมต่อลิตร และมีแนวโน้มลดลง เมื่อระยะเวลาการหมักในวันที่ 14 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของตัวอย่างคอมบูชาเท่ากับ 6.57±0.12 กรัมต่อลิตร

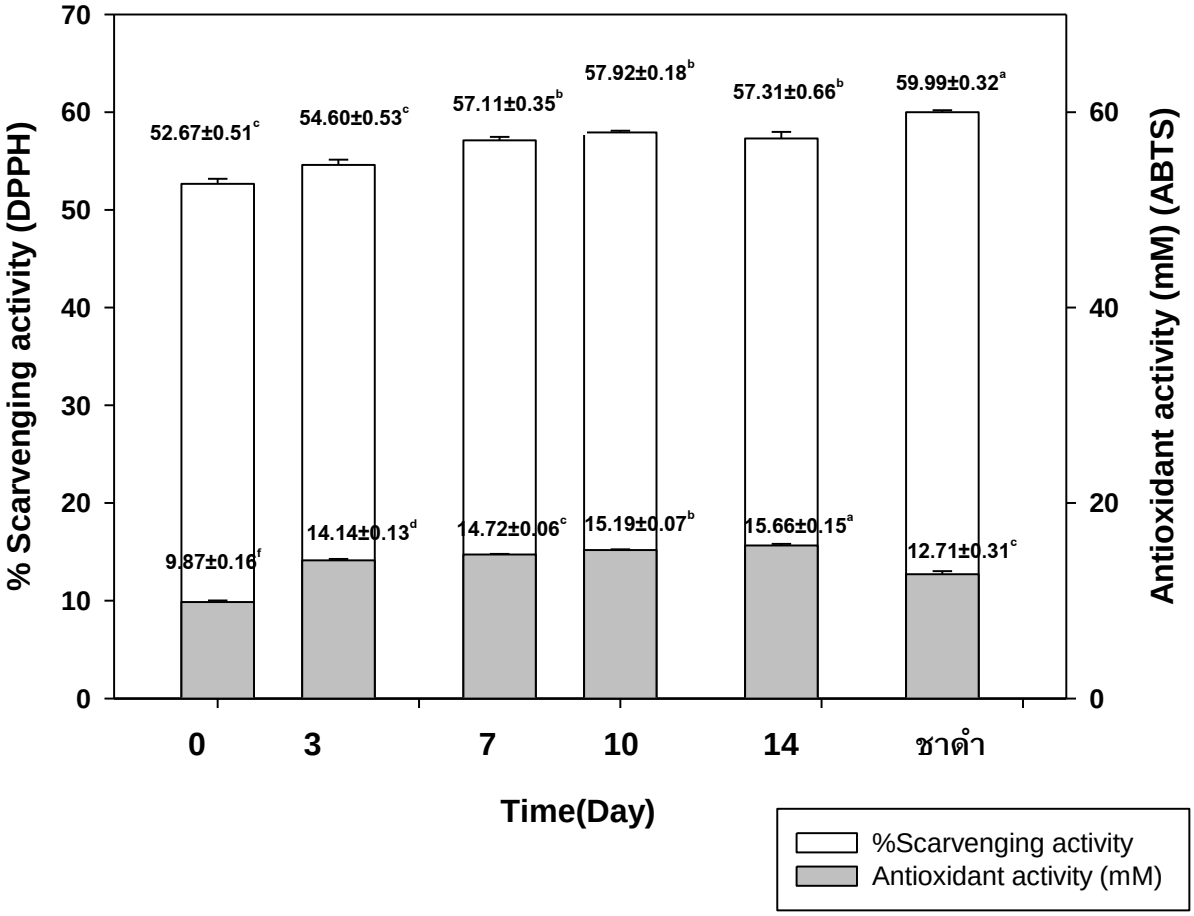


ภาพ 1 ความสัมพันธ์ของแบคทีเรียกรดอะซิติกและยีสต์ในกระบวนการหมักคอมบูชา



ภาพ 2 ลักษณะของแผ่นเซลลูโลสในกระบวนการหมักคอมบูชา
A) ลักษณะของแผ่นชั้นเซลลูโลส B) ลักษณะของแผ่นเซลลูโลส C) แบคทีเรียกรดอะซิติก

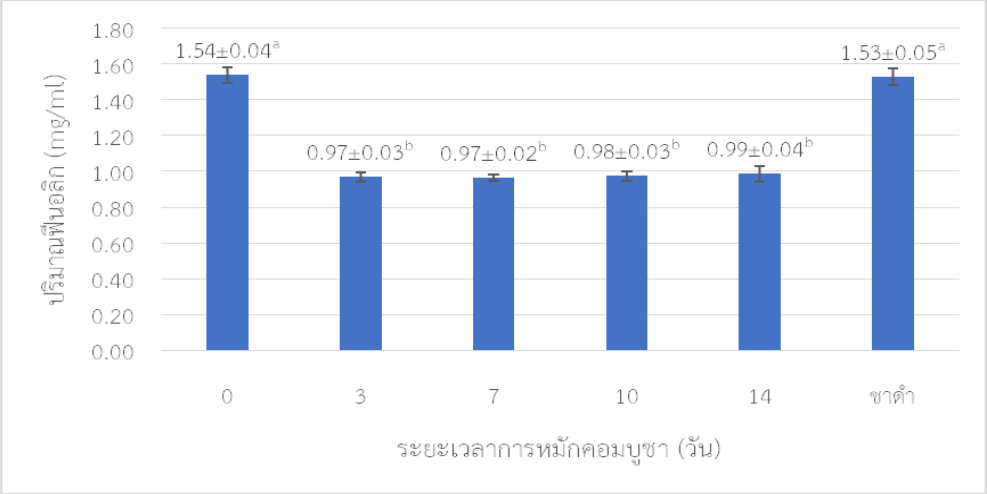
ผลการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของคอมบูชาด้วยวิธี DPPH พบว่า ค่าร้อยละ Scavenging activity ของตัวอย่างคอมบูชาเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมัก โดยมีค่าร้อยละ Scavenging activity เริ่มต้นของการหมักเท่ากับร้อยละ 52.67±0.51 (เทียบกับ ascorbic acid 234.46 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และมีค่าร้อยละ Scavenging activity สูงสุดเท่ากับร้อยละ 57.92±0.18 (เทียบกับ ascorbic acid 257.69 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ในระยะการหมักของวันที่ 10 จากนั้นค่าร้อยละ Scavenging activity จะลดลงเท่ากับร้อยละ 57.31±0.66 (เทียบกับ ascorbic acid 254.99 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ตัวอย่างคอมบูชามีค่าร้อยละ Scavenging activity น้อยกว่าชาดำที่ไม่ได้หมัก (59.99±0.32) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) จากการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ของคอมบูชาพบว่าปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างคอมบูชาเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการหมักอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.5$) โดยตัวอย่างคอมบูชาในวันเริ่มต้นของการหมักมีสารต้านอนุมูลอิสระ เท่ากับ 9.87±0.16 มิลลิโมลาร์ และเพิ่มขึ้นสูงสุดเท่ากับ 15.66±0.15 มิลลิโมลาร์เมื่อระยะเวลาการหมักผ่านไป 14 วัน เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระกับชาดำที่ไม่ได้หมัก พบมาว่า คอมบูชาตั้งแต่วันที่ 3 ของการหมักจนถึงวันที่ 14 ของการหมัก มีสารต้านอนุมูลอิสระมากกว่าชาดำที่ไม่ได้หมัก (12.71±0.31 มิลลิโมลาร์) แสดงดังภาพ 3



ภาพ 3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของคอมบูชาที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ ด้วยวิธี DPPH และ ABTS

หมายเหตุ: ตัวอักษร$^{a-f}$ ที่ต่างกันของแต่ละกราฟ มีความแตกต่างกันในทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวมของคอมบูชาพบว่ามีปริมาณฟีนอลิกรวมของตัวอย่างคอมบูชามากที่สุดในวันเริ่มต้นของการหมัก เท่ากับ 1.54±0.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และลดลงในวันที่ 3 เท่ากับ 0.97±0.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเริ่มมีปริมาณฟีนอลิกเพิ่มขึ้นเล็กน้อยตามระยะเวลาการหมัก โดยปริมาณฟีนอลิกของการหมักคอมบูชาวันที่ 14 เท่ากับ 0.99±0.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบปริมาณฟีนอลิก ชาดำที่ไม่ได้หมัก (1.53±0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) จะเห็นได้ว่าปริมาณฟีนอลิกในคอมบูชามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) แสดงดังภาพ 4 ตามระยะเวลาการหมัก



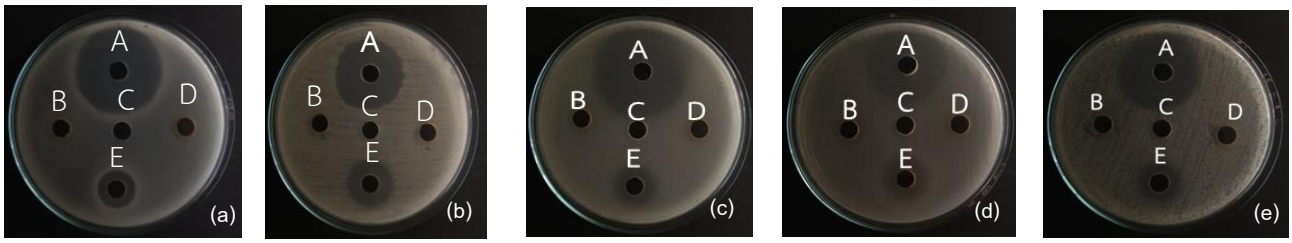
ภาพ 4 ปริมาณฟีนอลิกรวมของคอมบูชาที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ

ผลการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียของคอมบูชา โดยทดสอบกับเชื้อคือ *B. subtilis, B. cereus, Salmonella* sp., *S. aureus* และ *E. coli* ด้วยวิธี Agar well diffusion พบว่า ตัวอย่างคอมบูชาของวันเริ่มต้นของการหมัก (วันที่ 0) และตัวอย่างคอมบูชาวันที่ 3 ของการหมัก มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* และ *B. cereus* โดยมีค่าดัชนีการยับยั้งแบคทีเรีย (AI) ของคอมบูชาวันเริ่มต้นการหมักเท่ากับ 0.24±0.16 และ 1.00±0.38 ตามลำดับ ตัวอย่างคอมบูชาในวันที่ 3 ของการหมัก เท่ากับ 0.41±0.06 และ 0.90±0.16 ตามลำดับ แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *Salmonella* sp. *S. aureus* และ *E. coli* ได้ ตัวอย่างคอมบูชาของวันที่ 7 ของการหมัก สามารถยับยั้งเชื้อได้เพิ่มขึ้นจากวันที่ 0 และ 3 คือเชื้อ *Salmonella* sp.และ *S. aureus* แต่ไม่สามารถยับยั้ง *E.coli* ได้ คอมบูชาวันที่ 10 และ 14 สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบทั้งหมดได้ โดยมีค่าดัชนีการยับยั้งแบคทีเรียเท่ากับ 0.93±0.10 1.49±0.17 1.30±0.10 0.98±0.10 และ 1.12±0.24 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชาดำพบว่าไม่สามารถยังยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้ ข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากคอมบูชามีความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบและสามารถยับยั้งได้มากขึ้นตามระยะเวลาของการหมัก ดังแสดงในตาราง 1 และภาพ 5

ตาราง 1 ค่าดัชนีการยับยั้งแบคทีเรีย (Antibacterial index, AI) ของตัวอย่างคอมบูชา

ระยะเวลาการหมักคอมบูชา (วัน)	ค่าดัชนีการยับยั้งแบคทีเรีย (Antibacterial index, AI)				
	B. subtilis **TISTR 1528**	***B. cereus*** **ATCC 11778**	***S. typhimurium*** **ATCC 13311**	***S. aureus*** **ATCC 25923**	***E. coli*** **TISTR 117**
0	0.24±0.16	1.00±0.38	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง
3	0.41±0.06	0.90±0.16	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง
7	0.70±0.16^{b}	1.15±0.14^{a}	1.06±0.09^{a}	0.59±0.26^{a}	ไม่ยับยั้ง
10	0.54±0.05^{c}	1.08±0.16^{a}	0.93±0.11^{b}	0.73±0.23^{ab}	1.20±0.23^{a}
14	0.93±0.10^{c}	1.49±0.17^{a}	1.30±0.10^{b}	0.98±0.10^{ab}	1.12±0.24^{bc}

หมายเหตุ: ตัวอักษร$^{a-b}$ ที่ต่างกันตามแนวนอน มีความแตกต่างกันในทางสถิติ ($p \leq 0.05$)



ภาพ 5 ฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียของคอมบูชาที่ระยะเวลา 14 วัน: (a*) B. subtilis* TISTR 1528 (b) *B. cereus* ATCC 11778 (c) *E. coli* TISTR 117 (d) *S. typhimurium* ATCC 13311 (e*) S. aureus* ATCC 25923

หมายเหตุ: A) Positive control (1%chloramphenicol), B) คอมบูชา ปรับpH เท่ากับ 6,
C) Negative control (น้ำกลั่น), D) ชาดำ, E) คอมบูชา

จากผลการทดลองการวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์ของตัวอย่างคอมบูชาพบว่าแต่ละช่วงระยะเวลาการหมักคอมบูชาตั้งแต่วันที่เริ่มต้นการหมัก (วันที่ 0) จนถึงระยะเวลาการหมัก 14 วัน ไม่พบการปนเปื้อนของ *S. aureus Salmonella sp. E. coli* และ *B. cereus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร ดังนั้นตัวอย่างคอมบูชาผ่านเกณฑ์คุณภาพมาตราฐานคุณภาพทางจุลชีววิทยา ดังแสดงในตาราง 2

ตาราง 2 ผลการวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของตัวอย่างคอมบูชา

ระยะเวลาการหมัก	ชนิดของแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อน			
คอมบูชา (วัน)	***S. aureus***	***Salmonella sp.***	***E. coli***	***B. cereus***
0	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
3	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
7	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
14	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ

วิจารณ์

จากการศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพของผลิตภัณฑ์ที่ได้ในระหว่างการหมักคอมบูชา จะเห็นได้ว่าเริ่มต้นของการหมักคอมบูชา ตรวจพบปริมาณยีสต์เท่ากับ 3.27±0.13 log CFU/mL และมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ทั้งนี้เนื่องจากน้ำตาลทรายในส่วนประกอบของคอมบูชาซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนจะถูกไฮโดรไลซ์โดยเอนไซม์อินเวอร์เทสจากยีสต์ จากนั้นยีสต์จะใช้น้ำตาลกลูโคสและฟรุกโทสทำให้ยีสต์เพิ่มปริมาณและผลิตเอทานอล [16] ในสภาวะที่มีเอทานอลจะกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียกรดอะซิติกเปลี่ยนกลูโคสให้เป็นกรดกลูโคนิค และเปลี่ยนฟรุกโตสให้เป็นกรดอะซิติก เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักจะมีผลิตภัณฑ์สองส่วนประกอบด้วย เซลลูโลสซึ่งเป็นผลพลอยได้จากแบคทีเรียกรดอะซิติกและส่วนน้ำชาหมักคอมบูชา นอกจากนี้ สารประกอบที่สำคัญในชาหมักคอมบูชาพบว่าเป็นสารอาหารที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย อาทิ กรดกลูโคนิค กรดกลูคูโรนิค กรดอะซิติก กรดแลคติก กรดซิตริก กรดโฟลิค และกรดอะมิโน [17, 18]

จากนั้นปริมาณยีสต์มีค่าลดลงในวันที่ 14 ของการหมัก เนื่องจากการเจริญของแบคทีเรียกรดอะซิติกที่เพิ่มขึ้นหลังจากวันที่ 10 ของการหมัก โดยใช้เอทานอลนำมาผลิตกรดอะซิติก ส่งผลให้ค่าพีเอชลดลงประกอบกับการลดลงของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ทำให้สภาวะดังกล่าวไม่เหมาะกับการเจริญของยีสต์ ส่วนแบคทีเรียกรดอะซิติกที่ตรวจพบในตัวอย่างคอม

บูชาโดยแบคทีเรียกรดอะซิติกจะอาศัยอยู่ที่ส่วนแผ่นฟิล์มบนผิวหน้าคอมบูชาเนื่องจากแบคทีเรียกรดอะซิติกต้องการออกซิเจนในการเจริญสร้างแผ่นฟิล์มเซลล์ลูโลส เมื่อทดสอบปริมาณแบคทีเรียกรดอะซิติกจากแผ่นเซลลูโลส พบแบคทีเรียกรดอะซิติกลักษณะโคโลนีกลมโดยโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ GYC มีการสร้างโซนใสรอบโคโลนี โดยปริมาณแบคทีเรียกรดอะซิติกจากแผ่นเซลลูโลส จากการตรวจวัดปริมาณในระหว่างการหมักพบว่ามีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการหมัก ซึ่งแบคทีเรียกรดอะซิติกจะออกซิไดซ์เอทานอลเกิดเป็นกรดอะซิติก ปริมาณกรดอะซิติก ในตัวอย่างคอมบูชามีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการหมักผ่านไปโดยพบปริมาณกรดอะซิติกสูงสุดในวันที่ 14 ของการหมักเท่ากับ 0.74±0.03 กรัมต่อตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร ซึ่งปริมาณของกรดอะซิติกที่ใกล้เคียงกับงานของ Jayabalan และคณะ [19] ที่พบว่าปริมาณกรดของการหมักชาเขียวคอมบูชาแบบผสมเป็น 9.5 กรัมต่อลิตร หลังจากการหมัก 15 วัน และสนธิรัตน์ และคณะ [20] พบว่าปริมาณกรดของการหมักชาเขียวคอมบูชาแบบผสมเป็น 8.41 กรัมต่อลิตร หลังจากการหมักเป็นเวลา 6 วัน

จากผลการทดลองวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของคอมบูชาด้วยวิธี DPPH พบว่า ค่าร้อยละ Scavenging activity ของตัวอย่างคอมบูชาเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมัก โดยมีค่าร้อยละ Scavenging activity สูงสุดเท่ากับ 57.92±0.18 (เทียบกับ ascorbic acid 257.69 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ในระยะการหมักของวันที่ 10 สอดคล้องกับงานวิจัยของ Amarasinghe และคณะ [21] ซึ่งพบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของคอมบูชาเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมักอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้เนื่องจากการเพิ่มปริมาณของจุลินทรีย์ในคอมบูชาทำให้สารต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างคอมบูชาเพิ่มขึ้นตามไปด้วย นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงของปริมาณจุลินทรีย์หลักในคอมบูชาจากยีสต์เป็นปริมาณแบคทีเรียกรดอะซิติกที่เพิ่มขึ้นแทนภายหลังจากวันที่ 7 ของกระบวนการหมัก ส่งผลให้สารต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นตามไปด้วย [22] จากนั้นค่าร้อยละ Scavenging activity จะลดลง เท่ากับ 57.31±0.66 (เทียบกับ ascorbic acid 254.99 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) วันที่ 14 ของการหมัก เนื่องจากในสภาวะที่เป็นกรด phenolic compound จะมีความเสถียรมากขึ้นทำให้ยากที่จะปลดปล่อยโปรตรอนเพื่อที่จะไปจับกับ DPPH ดังนั้น antioxidant activity จึงลดลงวันที่ 14 ส่วนผลการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ของคอมบูชาพบว่าปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างคอมบูชาเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการหมักอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.5$) และสารต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างคอมบูชาเมื่อทำการหมักเป็นระยะเวลา 14 วันมีสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับชาดำที่ไม่ได้หมัก สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ivanišová และคณะ [23] สำหรับผลการทดลองวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวมของคอมบูชาพบว่าปริมาณฟีนอลิกรวมของตัวอย่างคอมบูชามีปริมาณลดลงจากวันเริ่มต้นของการหมักและค่อนข้างคงที่ตลอดระยะเวลาหมัก 14 วัน ทั้งนี้เนื่องจากสารโพลีฟีนอลในใบชาอาจถูก polimerlization เปลี่ยนโครงสร้างของสารให้ใหญ่ขึ้นหรือเปลี่ยนไปไม่อยู่ในกลุ่มของสารโพลีฟีนอลแล้ว การหาสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีฟีนอลิก จึงทำให้พบสารประกอบฟีนอลิกที่ลดลง [24]

จากผลการทดลองศึกษาฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียของคอมบูชา โดยมีเชื้อทดสอบดังนี้คือ *B. subtilis, B. cereus, Salmonella* sp., *S. aureus* และ *E. coli* ด้วยวิธี Agar well diffusion พบว่าฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียของตัวอย่างคอมบูชาจะเพิ่มขึ้นแปรผันตามระยะเวลาการหมัก โดยตัวอย่างคอมบูชาในวันที่ 14 ของกระบวนการหมักสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ทั้งหมด โดยมีค่าดัชนีการยับยั้งแบคทีเรีย (Antibacterial index, AI) เท่ากับ 0.93±0.10 1.49±0.17 1.30±0.10 0.98±0.10 และ 1.12±0.24 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชาดำ พบว่าไม่สามารถยังยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ ทั้งนี้เนื่องจากคอมบูชามีกรดอินทรีย์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ โดยเฉพาะกรดอะซิติกจากแบคทีเรียกรดอะซิติกในคอมบูชา [25-27] ดังนั้นจะเห็นได้ว่าคอมบูชามีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารได้รวมถึงแบคทีเรียที่ก่อโรคในอาหารต่างๆได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Sreeramulu และคณะ [28] พบว่าคอมบูชาสามารถยับยั้ง *Staphylococcus aureus*,

Shigella sonnei, *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila*, Yersinia *enterolitica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus epidermis*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus*, *Helicobacter pylori*, และ *Listeria monocytogenes* และงานวิจัยของ Kaewkod และคณะ [29] พบว่า คอมบูชาสามารถยับยั้ง *Escherichia coli*, *E. coli* O157: H7 DMST 12743, *Shigella dysenteriae* DMST 1511, *Salmonella Typhi* DMST 22842 และ *Vibrio cholera* ได้

จากผลการทดลองการวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์ของตัวอย่างคอมบูชาในการศึกษาครั้งนี้ ไม่พบการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรค *S. aureus Salmonella* sp. *E. coli* และ *B. cereus* ตลอดระยะเวลาการหมักเป็นเวลา 14 วัน ดังนั้นตัวอย่างคอมบูชาในการศึกษาครั้งนี้ผ่านเกณฑ์มาตราฐานคุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหาร

คุณสมบัติทางชีวภาพของคอมบูชาจากการศึกษาครั้งนี้ได้แก่ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักมีค่าเปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาการหมัก โดยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของคอมบูชามีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มระยะเวลาการหมัก ดังนั้นระยะเวลาที่เหมาะสมในการหมักคอมบูชาเพื่อให้ได้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูงสุดจึงเป็นสิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงถึงควบคู่ไปกับกลิ่นและรสชาติของคอมบูชาด้วยเช่นกัน นำมาซึ่งข้อมูลที่สำคัญสำหรับเป็นแนวทางในการพัฒนาผลิตภัณฑ์คอมบูชาเพื่อสุขภาพต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

1. Vajragupta O, Boonchoong P, Boonyarat C and Audsintong M. Radical scavenging agents. Bangkok: SP Print. 2549; 123-44.
2. Dufresne C, Farnworth E. Tea, Kombucha, and health: a review. Food Res. Int. 2000; 33(6): 409-421.
3. Yang Z, Ji B., Zhou F, Li B, Luo Y, Yang L, et al. Hypocholesterolaemic and antioxidant effects of kombucha tea in high-cholesterol fed mice. J. Sci. Food Agric. 2009; 89(1): 150-156.
4. Wang K, Gan X, Tang X, Wang S, Tan H. Determination of DSaccharic acid -1, 4 – lactone from brewed kombucha broth by high performance capillary electrophoresis. J. Chromatogr. 2010; 878: 371-374.
5. Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 1959; 31: 426-428.
6. A.O.A.C. Official Method of Analysis. The Association of Official Analytical Chemists. 2000. Gaithersburg, Maryland.
7. Lu M, Yuan B, Zeng M and Chen J. Antioxidant capacity and major phenolic compounds of spices commonly consumed in China. Food Research International. 2011; 44: 530- 536.
8. Wiriyaphan C, Chitsomboon B, Yongsawadigul J. Antioxidant activity of protein hydrolysates derived from threadfin bream surimi byproducts. Food Chem. 2012; 132: 104–111.
9. Matthäus B. Antioxidant Activity of Extracts Obtained from Residues of Different Oilseeds. J. Agric. Food Chem. 2002; 50: 3444–3452.
10. Mayo WJ. Chemical Methods of Control: Antimicrobial Drugs. In: Laboratory Experiments in Microbiology. Johnson TR, Case C.L. (Eds.), The Benjamin /Cummings PubLishing Company, San Francisco, CA, USA. 1998. pp. 179–181.
11. Assatarakul K, Himasuttidach N. Antioxidant and Antibacterial Activities of Onion Extract and Applications in Mixed Fruit and Vegetable Juice. Journal of Food Technology, Siam University. 2017; 12(1)1; 71-83.
12. Bacteriological Analytical Manual Online. Chapter 12: *Staphylococcus aureus*. USFDA. 2006; 10 pp. (http://www.cfsan.fda.gov).
13. Bacteriological Analytical Manual Online. Chapter 5: Salmonella. USFDA. 2007; 10 pp. (http://www.cfsan.fda.gov).

14. Bacteriological Analytical Manual Online. Chapter 4: Enumeration of *Escherichia coli* and thecoliform bacteria. USFDA. 2002; 10 pp. (http://www.cfsan.fda.gov).
15. Bacteriological Analytical Manual Online. Chapter 14: *Bacillus cereus*. USFDA. 2012; 10 pp. (http://www.cfsan.fda.gov).
16. Reiss J. Influence of different sugars on the metabolism of the tea fungus. Zeitschrift für Lebensmittel- Untersuchung und -Forschung A.1994; 198: 258-261.
17. Yang Z, Ji B, Zhou F, Li B, Luo Y, Yang L and Li T. Hypocholesterolaemic and antioxidant effects of kombucha tea in high-cholesterol fed mice. J. Sci. Food Agric. 2009; 89 (1); 150-156.
18. Radomir V Malbaša Eva S Lončar Jasmina S.VitasJasna M Čanadanović-Brunet. Influence of starter cultures on the antioxidant activity of kombucha beverage. Food Chemistry. 2011; 127: 1727–1731.
19. Jayabalan R, Marimuthu S and Swaminathan K. Changes in content of organic acids and tea polyphenols during Kombucha tea fermentation. Food Chem. 2007; 102: 392–398.
20. Charoenrak S, Bovonsombut S, Bovonsombut S. Isolation of Acetic Acid Bacteria for Kombucha Production by Pure Culture. Proceedings The 8th Science Research Conference. 30-31 May 2016. University of Phayao.
21. Amarasinghe H, Weerakkody NS, Waisundara VY. Evaluation of physicochemical properties and antioxidant activities of kombucha “Tea Fungus” during extended periods of fermentation. Food Sci Nutr. 2018; May 6(3): 659–665.
22. Chakravorty S, Bhattacharya S, Chatzinotas A, Chakraborty W, Bhattacharya D, Gachhui R. Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. Int. J. Food Microbiol. 2016; 220: 63–72.
23. Ivanišová E, Meňhartová K, Terentjeva M, Godočíková L, Árvay J, and Kačániová M. Kombucha tea beverage: Microbiological characteristic, antioxidant activity, and phytochemical composition. Acta Alimentaria. 2019; 48(3): 324–331.
24. Chu S C, Chen C. Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of kombucha. Food Chem. 2006; 98: 502–507.
25. Dibner J J, Buttin P. Use of organic acids as a model to study the impact of gut microflora on nutrition and metabolism. J. Appl. Poult. Res. 2002; 11: 453–463.
26. Ludovico P, Sansonetty F, Silva MT, Corte-Real M. Acetic acid induces a programmed cell death process in the food spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii*. FEMS Microbiol. Lett. 2003; 3: 91–96.
27. Greenwalt C, Ledford R, Steinkraus K. Determination and characterization of the antimicrobial activity of the fermented tea Kombucha. LWT - Journal of Food Science and Technology. 1998; 31: 291–296.
28. Sreeramulu G, Zhu Y, Knol W. Kombucha Fermentation and Its Antimicrobial Activity. J. Agric. Food Chem. 2000; 48(6): 2589–2594.
29. Kaewkod T, Bovonsombut S, Tragoolpua Y. Efficacy of Kombucha Obtained from Green, Oolong, and Black Teas on Inhibition of Pathogenic Bacteria, Antioxidation, and Toxicity on Colorectal Cancer Cell Line. Microorganisms. 2019; 7(12): 1-18.