

การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวมและความสามารถในการต้านออกซิเดชันของเครื่องดื่มคอมบูชาจากการหมักชาดำร่วมกับแก่นตะวัน

Determination of total phenolic content and antioxidant capacity of Kombucha beverage fermented from black tea and *Helianthus tuberosus* L.

ธีรธาร คำสะอึง¹, ธีรภัทร โฆสิตกุล¹, พัฒนา ศรีพลากิจ² และอรรสร สารพันโชติวิทย์³*

Teeratan Khamsaing¹, Thirapat Kositkul¹, Pattana Sripalakit² and Aurasorn Saraphanchotiwiththaya³*

Received: 18 April 2025 ; Revised: 20 June 2025 ; Accepted: 18 July 2025

บทคัดย่อ

คอมบูชาเป็นเครื่องดื่มชาหมักที่ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายจากคุณค่าทางสุขภาพ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณสารฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของคอมบูชาที่ผลิตจากชาดำอัสสัม (*Camellia sinensis*) ร่วมกับแก่นตะวัน (*Helianthus tuberosus* L.) โดยใช้จุลินทรีย์กลุ่ม symbiotic culture of bacteria and yeast (SCOBY) ในกระบวนการหมักทำการทดลองโดยเตรียมคอมบูชาชาดำ-แก่นตะวัน (JT), คอมบูชาชาดำ (T), คอมบูชาแก่นตะวัน (J) เทียบกับกลุ่มควบคุมชาดำ-แก่นตะวันไม่เติม SCOBY (JTN) และซูโครสหมัก (S) ประเมินคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ ปริมาณฟีนอลิกรวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-di-phenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) และ Ferric-reducing antioxidant power (FRAP) หลังการหมักเป็นเวลา 14 วัน โดยรวมพบว่าสูตรที่เติม SCOBY มีความชื้นมากขึ้น ทุกสูตรมีค่าพีเอช และปริมาณน้ำตาลลดลง ขณะที่ความหนืดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) สูตร JT มีปริมาณฟีนอลิกรวมสูงสุดเท่ากับ 1.69 ± 0.05 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อมิลลิลิตร ณ วันที่ 5 ซึ่งมีค่าสูงกว่าสูตร J แต่ต่ำกว่าสูตร T อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่าสูตร JT มีค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระสูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ 96.14 ± 0.15 ณ วันที่ 7 ซึ่งไม่แตกต่างจากสูตร T แต่สูงกว่าสูตร J อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) สำหรับการทดสอบด้วยวิธี FRAP พบว่าสูตร JT มีค่า FRAP สูงสุดเท่ากับ 24.12 ± 0.88 มิลลิกรัมสมมูลของเฟอร์รัสต่อมิลลิลิตร ณ วันที่ 7 ซึ่งไม่แตกต่างจากค่าสูงสุดของสูตร J แต่ต่ำกว่าสูตร T อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) สรุปได้ว่า การหมักชาดำร่วมกับแก่นตะวันโดยใช้ SCOBY ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ ปริมาณสารฟีนอลิกรวม และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์ โดยสูตรคอมบูชาชาดำ-แก่นตะวัน (JT) ให้ปริมาณสารฟีนอลิกรวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอยู่ในระดับสูงตลอดการหมัก สะท้อนถึงศักยภาพของแก่นตะวันในการใช้เป็นวัตถุดิบร่วมในการผลิตคอมบูชา และมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นเครื่องดื่มฟังก์ชันในอนาคต

คำสำคัญ: คอมบูชา, ชาดำ, แก่นตะวัน, ฟีนอลิกรวม, ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

Abstract

Kombucha is a popular fermented tea beverage widely recognized for its potential health benefits. This study aimed to investigate the total phenolic content and antioxidant activity of kombucha prepared from Assam black tea (*Camellia sinensis*) combined with Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.), using a symbiotic culture of bacteria and yeast (SCOBY) for fermentation. Kombucha samples were prepared from various formulations, including fermented black

¹ นิสิตเภสัชศาสตร์, ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

² รองศาสตราจารย์, ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

³ รองศาสตราจารย์, ภาควิชาเภสัชเคมีและเภสัชเวช คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

¹ Pharm.D. student, Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University

² Associate Professor, Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University

³ Associate Professor, Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University

* Corresponding author: Aurasorn Saraphanchotiwiththaya, Email: aurasorns@nu.ac.th

tea with Jerusalem artichoke (JT), fermented black tea (T), fermented Jerusalem artichoke (J), unfermented tea with Jerusalem artichoke (JTN), and fermented sucrose (S). Physicochemical properties, total phenolic content, and antioxidant activity were evaluated using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay and ferric-reducing antioxidant power (FRAP) assay after 14 days of fermentation. The results revealed a significant decrease in pH, clarity, and sugar content, along with an increase in viscosity across all fermented samples. The JT formulation exhibited the highest total phenolic content of 1.69 ± 0.05 mg gallic acid equivalents/mL on day 5, which was slightly higher than J and significantly lower than T ($p < 0.05$). Antioxidant activity assessed by DPPH showed that JT had the highest percentage of inhibition of $96.14 \pm 0.15\%$ on day 7, comparable to T but significantly higher than J ($p < 0.05$). FRAP analysis demonstrated that JT exhibited the greatest ferric-reducing power of 24.12 ± 0.88 mg ferrous equivalents/mL on day 7, similar to J (day 14) but slightly lower than T (day 7) ($p < 0.05$). It can be concluded that fermentation of black tea and Jerusalem artichoke with SCOBY significantly affected the physicochemical characteristics, total phenolic content, and antioxidant activity of the beverages. The black tea-Jerusalem artichoke kombucha (JT) demonstrated high phenolic content and antioxidant activity during fermentation, indicating the potential of Jerusalem artichoke as an alternative substrate for the development of functional kombucha beverages.

Keywords: Kombucha, black tea, Jerusalem artichoke, total phenolic content, antioxidant activity

บทนำ

คอมบูชา (Kombucha) เป็นเครื่องดื่มหมักจากชาซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพที่ได้รับความนิยมเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยทั่วไปนิยมใช้ชาดำหรือชาเขียวเป็นวัตถุดิบหลักในการหมักร่วมกับจุลินทรีย์ที่ทำงานร่วมกันในลักษณะพึ่งพาอาศัยกัน ที่เรียกว่า SCOBY (Symbiotic Culture of Bacterium and Yeast) ประกอบด้วยยีสต์หลายชนิดและแบคทีเรียกรดอะซิติก (acetic acid bacteria) ที่มีบทบาทร่วมกันในการเปลี่ยนน้ำตาลในน้ำชาให้เป็นสารต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์ (Gaggia *et al.*, 2018; Kapp & Sumner, 2019) กระบวนการหมักคอมบูชามีส่วนช่วยเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์ โดยสามารถเพิ่มระดับของน้ำตาลบางชนิด แร่ธาตุ วิตามิน และกรดอินทรีย์ นอกจากนี้ ยังมีการผลิตสารที่มีฤทธิ์ชีวภาพ เช่น เอนไซม์ และสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิ โดยเฉพาะสารพอลิฟีนอล ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ และมีบทบาทในการส่งเสริมสุขภาพของผู้บริโภค ประวัติการบริโภคคอมบูชามีมาอย่างยาวนาน โดยมีแหล่งกำเนิดในประเทศแถบเอเชียตะวันออก ได้แก่ ญี่ปุ่น จีน และรัสเซีย และในช่วงหลายทศวรรษที่ผ่านมา คอมบูชาได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายในประเทศตะวันตก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสหรัฐอเมริกา (Jarrell *et al.*, 2000) ซึ่งสะท้อนให้เห็นถึงแนวโน้มความสนใจด้านสุขภาพของผู้บริโภคในระดับสากล

คอมบูชาเป็นเครื่องดื่มที่มีสรรพคุณต่างๆ มากมาย ที่ช่วยส่งเสริมสุขภาพ เช่น มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านแบคทีเรีย ต้านอักเสบ ต้านมะเร็ง (Kitwetcharoen *et al.*, 2023) ส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกัน ช่วยการทำงานของตับ และลด

ความเสี่ยงของโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง เช่น เบาหวาน ความดันโลหิตสูง โรคหัวใจและหลอดเลือด (Khan & Mukhtar, 2018) อย่างไรก็ตาม คอมบูชาที่มีจำหน่ายทั่วไปมักมีรสชาติเปรี้ยวจืดจากการดองน้ำส้ม (acetic acid) ทำให้รับประทานได้ยาก อีกทั้งผลิตภัณฑ์คอมบูชาในท้องตลาดมีปริมาณน้ำตาลค่อนข้างสูงอาจไม่เหมาะกับผู้ป่วยเบาหวาน หรือผู้ที่ต้องการควบคุมน้ำหนัก และผู้บริโภคบางกลุ่มอาจต้องการเครื่องดื่มคอมบูชาที่มีปริมาณคาเฟอีนต่ำ ตัวอย่างแนวทางการพัฒนาคอมบูชาในปัจจุบัน ได้แก่ การใช้วัตถุดิบจากธรรมชาติ เช่น ผลไม้และสมุนไพร เพื่อช่วยปรับปรุงรสชาติ ลดปริมาณการเติมน้ำตาล และเพิ่มคุณค่าทางเภสัชวิทยาของผลิตภัณฑ์คอมบูชา การใช้สารตั้งต้นทางเลือก เช่น ผุ่นชา (tea dust) ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตชา และกากน้ำตาลเข้มข้น (blackstrap molasses) ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการผลิตน้ำตาล เพื่อช่วยลดปริมาณของเสียจากอุตสาหกรรมและเพิ่มความยั่งยืนในกระบวนการผลิตคอมบูชา (Selvaraj & Gurumurthy, 2024) สำหรับในประเทศไทย คอมบูชาที่วางจำหน่ายในปัจจุบันส่วนใหญ่ผลิตจากการหมักชาดำ หรือชาเขียวเป็นหลัก ขณะที่คอมบูชาที่ผสมสมุนไพรหรือวัตถุดิบท้องถิ่นอื่น ๆ ยังคงพบได้น้อยในเชิงพาณิชย์

แก่นตะวัน (Jerusalem artichoke; *Helianthus tuberosus* L.) เป็นพืชสมุนไพรในวงศ์ Asteraceae มีถิ่นกำเนิดในทวีปอเมริกาเหนือ เป็นพืชล้มลุก มีลำต้นสั้น ดอกสีเหลืองคล้ายดอกบัวตองหรือดอกทานตะวัน และมีหัวสะสมอาหารใต้ดิน มีการนำเข้ามาปลูกในพื้นที่ภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย (Niljantuk *et al.*, 2019)

ส่วนหัวใต้ดินของแก่นตะวันมีคุณค่าทางโภชนาการสูง อุดมไปด้วยคาร์โบไฮเดรตเชิงซ้อนและอินูลิน (inulin) ซึ่งเป็นพรีไบโอติก (prebiotic) ที่มีประโยชน์ต่อระบบทางเดินอาหารและช่วยส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในลำไส้ (Shao *et al.*, 2020) เครื่องดื่มสารสกัดจากแก่นตะวันมีรสชาติดี ช่วยปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Sawicka *et al.*, 2020) มีส่วนช่วยเพิ่มระบบภูมิคุ้มกัน และลดความเสี่ยงในการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดได้ นอกจากนี้ยังพบสาร fructo-oligosaccharide ในหัวแก่นตะวันซึ่งให้รสหวานแต่มีค่าดัชนีน้ำตาลต่ำ เหมาะสำหรับผู้ป่วยเบาหวานหรือผู้ที่ต้องการควบคุมระดับน้ำตาลและไขมันในเลือด (Puttha & Charoenphun, 2020)

แนวคิดในการผสมผสานคอมบูชากับแก่นตะวัน เป็นแนวทางหนึ่งที่มีศักยภาพในการพัฒนาเครื่องดื่มสุขภาพที่มีคุณค่าทางโภชนาการและมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน อย่างไรก็ตาม แม้ว่าจะมีรายงานการศึกษาการหมักคอมบูชาร่วมกับวัตถุดิบหลากหลายชนิด แต่ยังขาดข้อมูลเชิงลึกที่เปรียบเทียบปริมาณพอลิฟีนอลและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของคอมบูชาที่หมักร่วมกับสมุนไพร โดยเฉพาะอย่างยิ่ง แก่นตะวันในลักษณะที่เป็นระบบและครอบคลุม

ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณพีนอลรวม (total phenolic content) และความสามารถในการต้านออกซิเดชัน (antioxidant capacity) ของเครื่องดื่มคอมบูชาที่เตรียมจากชาดำหมักร่วมกับแก่นตะวัน อันจะนำไปสู่การพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มเพื่อสุขภาพทางเลือกที่มีคุณภาพ และตอบสนองต่อความต้องการของผู้บริโภคที่ใส่ใจในการดูแลสุขภาพ

การทดลอง

1. แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) ประกอบด้วย 5 สูตร ได้แก่ สูตร JT: คอมบูชาชาดำ-แก่นตะวัน, T: คอมบูชาชาดำ, J: คอมบูชาแก่นตะวัน และกลุ่มควบคุมสูตร JTN: ชาดำ-แก่นตะวันไม่เติม SCOBY และ สูตร S: ชูโครสเติม SCOBY แต่ละสูตรทำสามซ้ำ และทำการติดตามผลที่ระยะเวลาการหมัก 0, 5, 7 และ 14 วัน

2. แหล่งที่มาของวัตถุดิบ และสารเคมี

ใบชาชาดำอัสสัม และ commercial SCOBY (Symbiotic Culture of Bacterium and Yeast) ได้จากร้าน Nature Kombucha จังหวัดขอนแก่น หัวสดหรือลำต้นใต้ดินของแก่นตะวัน ได้จากไร่กสิวิวัฒนา อำเภอบ้านไผ่ จังหวัดขอนแก่น Trolox, gallic acid, 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

(DPPH), 2, 4, 6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ), Folin Ciocalteu reagent ได้จากบริษัท Sigma-Aldrich (Switzerland), ferrous sulfate และ sodium acetate trihydrate ได้จากบริษัท Kemaus (Australia), sodium carbonate และ ferric chloride ได้จากบริษัท Merck KgaA (Germany)

3. การเตรียมน้ำสกัดชาดำ

นำใบชาดำแห้งปริมาณ 12 กรัม ชงในน้ำร้อนอุณหภูมิ 90-100 องศาเซลเซียส ปริมาณ 1 ลิตร เป็นเวลา 7-10 นาที กรองด้วยผ้าขาวบาง แล้วทิ้งไว้ให้เย็นลง

4. การเตรียมน้ำสกัดแก่นตะวัน

นำหัวแก่นตะวันมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำเปล่าลดขนาดโดยการหั่นให้มีขนาดประมาณ 2 เซนติเมตร นำไปต้มกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนัก ณ อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที กรองด้วยผ้าขาวบาง และกระดาศกรอง ทิ้งไว้ให้เย็นลง

5. การเตรียมคอมบูชาและกลุ่มควบคุม

เตรียมคอมบูชาและกลุ่มควบคุมจำนวน 5 สูตร สูตรละ 3 ฟลasks ดังนี้ (1) คอมบูชาสูตร JT: น้ำชาดำและน้ำสกัดแก่นตะวันอย่างละ 125 มิลลิลิตร (2) คอมบูชาสูตร T: น้ำชาดำ 250 มิลลิลิตร (3) คอมบูชาสูตร J: น้ำสกัดแก่นตะวัน 250 มิลลิลิตร โดยสูตร (1) – (3) เติม SCOBY ส่วนเนื้อที่ผ่านการตัดแบ่งเพื่อลดขนาด 8 กรัม และส่วนน้ำ 10 มิลลิลิตร และชูโครส 12.5 กรัม (4) กลุ่มควบคุมสูตร JTN: น้ำชาดำและน้ำสกัดแก่นตะวันอย่างละ 125 มิลลิลิตร ชูโครส 12.5 กรัม และน้ำ 18 มิลลิลิตร โดยไม่เติม SCOBY และ (5) กลุ่มควบคุมสูตร S: ชูโครส 12.5 กรัม น้ำ 250 มิลลิลิตร และ SCOBY ส่วนเนื้อ 8 กรัม และส่วนน้ำ 10 มิลลิลิตร ในการเตรียมแต่ละสูตรจะผสมน้ำชาดำ น้ำสกัดแก่นตะวัน และชูโครส ใน Erlenmeyer flask ขนาด 500 มิลลิลิตร โดยยังไม่เติม SCOBY ใช้สำลีและอลูมิเนียมฟอยล์ปิดปากฟลask นำไปทำให้ปราศจากเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ณ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วจึงเติม SCOBY ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique) จากนั้นทำการหมักเป็นเวลา 14 วัน ภายใต้สภาวะนิ่งโดยไม่มีการเขย่าระหว่างการหมักเพื่อจำลองกระบวนการหมักแบบดั้งเดิม เก็บที่อุณหภูมิห้อง (27 ± 2 °C) ในภาวะแสงปกติ หลีกเลี่ยงแสงแดดและความร้อน ดำเนินการเก็บตัวอย่างครั้งละ 5 มิลลิลิตร ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ ณ วันที่ 0, 5, 7 และ 14 ของการหมัก เพื่อนำไปทดสอบส่วนต่อไป

6. การประเมินคุณสมบัติทางกายภาพและเคมี

ประเมินคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของตัวอย่างทดสอบก่อนและหลังการหมัก ดังนี้ ประเมินสีโดยการสังเกตด้วยตาเปล่าร่วมกับการเทียบสีด้วย Munsell color chart ประเมินกลิ่นโดยการดมกลิ่น ประเมินความใส (clarity) โดยการสังเกตด้วยตาเปล่า และประเมินความหนืด (viscosity) โดยใช้เครื่อง Viscometer type cone and plate (DVNext Cone/Plate Rheometer, Brookfield Ametek, UK) ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 วินาที ณ อุณหภูมิห้อง (27 ± 2 องศาเซลเซียส) และวัดค่า pH ด้วย pH meter (pH700, Eutech, Singapore)

7. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล

วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลด้วยเครื่อง refractometer (RX-5000, Atago, Japan) ณ อุณหภูมิห้อง (27 ± 2 องศาเซลเซียส) เทียบกับ Brix chart

8. การเตรียมตัวอย่างทดสอบสำหรับการวิเคราะห์

ใช้ไมโครปิเปต (micropipette) ดูดตัวอย่างทดสอบปริมาณ 2 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยง (centrifuge tube) นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) (3531 Microcentrifuge, Abbott, USA) ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใส (supernatant) ที่ได้ไปทดสอบส่วนต่อไป

9. การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม (total phenolic content; TPC)

เตรียมสารละลายต่างๆ ในการทดสอบ ได้แก่ gallic acid ความเข้มข้นสุดท้าย 2.5 - 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 10%w/v Folin-Ciocalteu reagent และ 1.5%w/v Na_2CO_3 ใช้ micropipette ดูดสารละลาย gallic acid แต่ละความเข้มข้นปริมาณ 20 ไมโครลิตร เติมลงใน 96-well plate จากนั้นเติม Folin-Ciocalteu reagent 50 ไมโครลิตร และสารละลาย Na_2CO_3 80 ไมโครลิตร ตามลำดับ ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่ม (incubate) ณ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หมั่นด้วยอุลุมิเนียมฟอยด์ แล้วบ่มทิ้งไว้ในที่มืดอีก 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader (SynergyH1, BioTek, Norway) สร้างกราฟมาตรฐานของ gallic acid โดย plot ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง และความเข้มข้น เพื่อหาสมการเส้นตรงและค่า r^2 (Singleton *et al.*, 1999)

ทดสอบเช่นเดียวกันด้วยคอมบูชาและกลุ่มควบคุมวัดค่าการดูดกลืนแสง และคำนวณปริมาณฟีนอลิกรวมจากสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐาน gallic acid ในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของ gallic acid ต่อคอมบูชา 1 มิลลิลิตร (mg gallic acid equivalent (GAE)/mL)

10. การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

เตรียมสารละลายต่างๆ ในการทดสอบ ได้แก่ DPPH 0.2 มิลลิโมลาร์ และ Trolox ความเข้มข้นสุดท้าย 10-40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้ micropipette ดูดสารละลาย Trolox คอมบูชา หรือกลุ่มควบคุม ปริมาณ 50 ไมโครลิตร เติมลงใน 96-well plate จากนั้นเติม DPPH 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่าเบาๆ แล้วบ่มไว้ในที่มืด 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร ด้วย microplate reader และคำนวณร้อยละในการต้านออกซิเดชัน (%Inhibition) เทียบกับ Trolox (Blois, 1958) ดังสมการต่อไปนี้

$$\% \text{Inhibition} = \left[\frac{(\text{Abs}_{\text{blank}} - \text{Abs}_{\text{sample}})}{\text{Abs}_{\text{blank}}} \right] \times 100$$

เมื่อ $\text{Abs}_{\text{blank}}$ คือค่าการดูดกลืนแสงของ blank (ไม่เติมสารทดสอบ) และ $\text{Abs}_{\text{sample}}$ คือค่าการดูดกลืนแสงของสารทดสอบ

11. การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

เตรียมสารละลายต่างๆ ในการทดสอบ ได้แก่ FRAP reagent (acetate buffer 300 มิลลิโมลาร์ pH 3.6, TPTZ 10 มิลลิโมลาร์ ใน 40 มิลลิโมลาร์ hydrochloric acid, ferric chloride 20 มิลลิโมลาร์ อัตราส่วน 10:1:1) และ ferrous sulphate ความเข้มข้นสุดท้าย 0.001-0.05 มิลลิโมลาร์ ใช้ micropipette ดูดสารละลาย FRAP reagent ปริมาณ 270 ไมโครลิตร เติมลงใน 96-well plate จากนั้นเติม ferrous sulphate ปริมาณ 30 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่าเบาๆ แล้วบ่มไว้ในที่มืด 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 593 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader สร้างกราฟมาตรฐานของ ferrous sulphate โดย plot ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง และความเข้มข้น เพื่อหาสมการเส้นตรงและค่า r^2 (Benzie & Strain, 1996)

ทดสอบเช่นเดียวกันด้วยคอมบูชาและกลุ่มควบคุมวัดค่าการดูดกลืนแสง และคำนวณค่า FRAP จากกราฟมาตรฐานของ ferrous sulfate ในหน่วยมิลลิกรัมเฟอร์รัสต่อคอมบูชา 1 มิลลิลิตร (mg Fe^{2+} /mL)

12. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลถูกวิเคราะห์ด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-way ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างสูตร ณ ระยะเวลาการหมักเดียวกัน ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$ นอกจากนี้ ค่าที่แสดงการเปลี่ยนแปลงสูงสุดหรือต่ำสุดของแต่ละสูตรตลอดระยะเวลาการหมักถูกนำมาเปรียบเทียบกับค่าเริ่มต้น (Day 0) โดยใช้สถิติ Student's *t*-test ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$ ผลการทดลองแสดงในรูปค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean $\pm$ SD) จากการทดลองอิสระ 3 ซ้ำ ($n = 3$) และวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics Version 26.0

ผลการทดลองและอภิปรายผล

1. คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของคอมบูชา

1.1 สี (color) และกลิ่น (odor) ของคอมบูชา

จากการสังเกตสีของคอมบูชาสูตร JT, J และ T ตลอดจนกลุ่มควบคุมสูตร JTN และ S ที่เตรียมเสร็จใหม่ด้วยตาเปล่าร่วมกับการเทียบสีผ่าน Munsell color chart พบว่าคอมบูชาสูตร JT และกลุ่มควบคุมสูตร JTN มีสีน้ำตาล ซึ่งเกิดจากสีตามธรรมชาติของชาดำและแกนตะวัน สำหรับคอมบูชาสูตร T มีสีน้ำตาลเข้ม สูตร J มีสีน้ำตาลอมเหลือง และกลุ่มควบคุมสูตร S มีสีเหลืองอ่อน เมื่อหมักครบ 14 วัน พบว่าสีของสูตร JT (10YR 6/6) และ JTN (7.5YR 5/8) รวมทั้งสูตร T (7.5YR 4/6) และ J (2.5Y 6/4) มีสีอ่อนลง ต่างจากสูตร S (2.5Y 9/2) ที่มีสีเข้มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด (Figure 1)

จากการประเมินกลิ่นหลังหมักครบ 14 วัน พบว่าสูตรที่เดิม SCOBY (JTN, JT, J) เกิดกลิ่นเปรี้ยวของกรดอะซิติก โดยสูตรคอมบูชาทั้งสามสูตรจะมีกลิ่นผสมผสานระหว่างกลิ่นกรดอะซิติก กลิ่นชา และแกนตะวันตามวัตถุดิบที่ใช้ในการหมัก ขณะที่กลุ่มควบคุมสูตร JTN มีเพียงกลิ่นของชาดำ และกลิ่นธรรมชาติของแกนตะวันเท่านั้น กลิ่นเปรี้ยวดังกล่าวเกิดจากกระบวนการหมักของแบคทีเรียกรดอะซิติก (acetic acid bacteria) ที่เปลี่ยนน้ำตาลในคอมบูชาให้กลายเป็นกรดอะซิติก สอดคล้องกับงานวิจัยของ Wang *et al.* (2022) ที่รายงานว่าหลังการหมักคอมบูชาเป็นเวลา 14 วัน จะพบปริมาณกรดอะซิติกเพิ่มขึ้น และค่า pH ลดลง โดยสีของคอมบูชาที่จางลงหลังการหมัก อาจสัมพันธ์กับระดับความเป็นกรดที่เพิ่มขึ้น Zou และคณะ (2021) กล่าวว่าสารแอนโทไซยานิน (anthocyanins) ซึ่งเป็นสารให้สีในพืชจะเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเมื่อค่า pH เปลี่ยนไป ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของสีในเครื่องดื่มคอมบูชาอย่างมีนัยสำคัญ

1.2 ความหนืด (Viscosity) ของคอมบูชา

คอมบูชาทุกสูตร (JT, T, J) และกลุ่มควบคุม (JTN, S) มีค่าความหนืด ณ วันเริ่มต้น (day 0) แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยมีค่าระหว่าง 1.05 – 1.50 cP โดยสูตรที่มีน้ำตาลกักแค้นตะวันเป็นส่วนผสม (JT, T และ JTN) จะมีความหนืดสูงกว่าสูตรที่ไม่มีน้ำตาลกักแค้นตะวัน (T และ S) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยสูตร JT มีความหนืดเริ่มต้น 1.31 ± 0.03 cP ซึ่งไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมสูตร JTN แต่ต่ำกว่าสูตร J และสูงกว่าสูตร T และกลุ่มควบคุม S อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ระหว่างการหมัก 14 วัน พบว่าทุกสูตรมีความหนืดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยเฉพาะอย่างยิ่งสูตร JT ซึ่งมีความหนืดสูงสุดเท่ากับ 2.06 ± 0.02 cP ณ วันที่ 7 ซึ่งสูงกว่าวันเริ่มต้น และสูงกว่าทุกสูตรอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) คาดว่าความหนืดที่เพิ่มขึ้นเกิดจากแป้งที่เป็นองค์ประกอบหลักของแกนตะวันและอินูลินซึ่งเป็นใยอาหารในกลุ่มโอลิโกแซ็กคาไรด์ (oligosaccharide) (Table 1 และ Figure 2a) สอดคล้องกับการศึกษาของ Watawana *et al.* (2016) และ Jakubczyk *et al.* (2020) ซึ่งรายงานว่าหลังการหมัก ความหนืดของคอมบูชามีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ในขณะที่ Tomar *et al.* (2023) รายงานว่าความหนืดอาจเพิ่มขึ้นหรือลดลงได้จากผลของสารที่หมักร่วมกับชาหมักคอมบูชา

1.3 ความใส (Clarity) ของคอมบูชา

จากการสังเกตพบว่าคอมบูชาทุกสูตร (JT, T, J) และกลุ่มควบคุม (JTN, S) เริ่มต้น (day 0) มีความใสมาก เมื่อหมักเป็นเวลา 14 วัน พบว่าสูตรที่เดิม SCOBY (JT, T, J, S) มีความขุ่นมากขึ้น โดยสูตร JT และ T มีความขุ่นเพิ่มขึ้นมากที่สุด ตามด้วยสูตร J และ S ตามลำดับ Amarasinghe *et al.* (2018) สันนิษฐานว่าความใสที่ลดลงเกิดจากการที่เชื้อสร้างเซลลูโลส (cellulose) เพิ่มขึ้นระหว่างกระบวนการหมักสำหรับสูตรชาดำผสมแกนตะวันไม่หมัก (JTN) ยังคงมีความใสไม่แตกต่างจากเมื่อเตรียมเสร็จใหม่

1.4 ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของคอมบูชา

คอมบูชาทุกสูตร (JT, T, J) และกลุ่มควบคุม (JTN, S) มีค่า pH ณ วันเริ่มต้น (day 0) อยู่ในช่วง 5.08-6.52 โดยคอมบูชาสูตร JT มีค่า pH เท่ากับ 5.83 ± 0.06 ซึ่งไม่แตกต่างจากสูตร J และกลุ่มควบคุม JTN แต่สูงกว่าสูตร T และต่ำกว่ากลุ่มควบคุม S อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ระหว่างการหมัก 14 วัน ค่า pH ของทุกสูตรมีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยสูตร JT มีค่า pH ลดลงเป็น

3.44±0.03 ณ วันที่ 14 ซึ่งต่ำกว่าค่าเริ่มต้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบ ณ วันที่เดียวกัน พบว่าสูตร JT มีค่า pH สูงกว่าสูตร T (2.73±0.04) แต่ต่ำกว่าสูตร J (3.74±0.05) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ขณะที่กลุ่มควบคุม JTN มีค่า pH ลดลงเป็น 5.32±0.03 ณ วันที่ 14 ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงที่ค่อนข้างน้อยเมื่อเทียบกับสูตรที่ผ่านการหมักด้วย SCOBY (Table 2 และ Figure 2b)

ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับรายงานของ Jakubczyk *et al.* (2020) ที่พบว่าการลดลงของค่า pH ในคอมบูชาเกิดจากการสร้างกรดอินทรีย์ระหว่างกระบวนการหมัก โดยเฉพาะกรดอะซิติกซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์เมแทบอลิซึมที่สำคัญของจุลินทรีย์ใน SCOBY ขณะที่กลุ่มควบคุม JTN ซึ่งไม่เติม SCOBY มีการลดลงของค่า pH เพียงเล็กน้อย สะท้อนให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวมีความเกี่ยวข้องกับกิจกรรมของจุลินทรีย์ระหว่างกระบวนการหมักเป็นหลัก



Figure 1 Color of kombucha on day 14 of fermentation: (a) JTN – unfermented black tea with Jerusalem artichoke, (b) JT – fermented black tea with Jerusalem artichoke, (c) T – fermented black tea, (d) J – fermented Jerusalem artichoke, and (e) S – fermented sucrose.

1.5 ปริมาณน้ำตาล (Total sucrose contents) ในคอมบูชา

ผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยประมาณในคอมบูชาและกลุ่มควบคุมด้วยเครื่อง Brix refractometer พบว่า สูตรที่มีส่วนผสมของแก่นตะวัน (JT, J และ JTN) มีค่า %Brix ณ วันเริ่มต้น (day 0) สูงกว่าสูตรที่ไม่มีแก่นตะวัน (T และ S) โดยสูตร J มีค่า %Brix สูงสุดเท่ากับ 11.98±0.36% (Table 3) ขณะที่สูตร JT มีค่า %Brix ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม JTN แต่สูงกว่าสูตร T และกลุ่มควบคุม S อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

หลังการหมักเป็นเวลา 14 วัน ปริมาณน้ำตาลของคอมบูชาทุกสูตรมีแนวโน้มลดลง โดยสูตร JT มีค่า %Brix ลดลงจาก 8.34±0.54% เป็น 6.98±0.69% ซึ่งต่ำกว่าค่าเริ่มต้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) การลดลงของปริมาณน้ำตาลในสูตร JT สูงกว่ากลุ่มควบคุม JTN ซึ่งไม่เติม SCOBY ขณะที่สูตร T และ J แสดงแนวโน้มการลดลงในลักษณะเดียวกัน ส่วนกลุ่มควบคุม S มีค่า %Brix ลดลงเพียงเล็กน้อยและไม่แตกต่างจากค่าเริ่มต้นอย่างมีนัยสำคัญ (Table 3 และ Figure 2c)

หัวแก่นตะวันเป็นแหล่งของน้ำตาลธรรมชาติหลายชนิด ได้แก่ ฟรุคโตส กลูโคส และอินูลิน ซึ่งมีส่วนทำให้สูตรที่มีแก่นตะวันมีค่า %Brix เริ่มต้นสูงกว่าสูตรที่ไม่มีแก่นตะวัน นอกจากนี้ อินูลินซึ่งเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ในกลุ่มฟรุคแทน (fructan) ยังสามารถถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ระหว่างการหมักให้เป็นน้ำตาลฟรุคโตสได้ (Puttha & Charoenphun, 2020)

ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับรายงานของ Jakubczyk *et al.* (2020) ที่พบว่าปริมาณน้ำตาลในคอมบูชาลดลงอย่างต่อเนื่องระหว่างการหมัก เนื่องจากยีสต์ใน SCOBY ใช้น้ำตาลเป็นแหล่งพลังงานและเปลี่ยนเป็นเอทานอล ขณะที่แบคทีเรียกรดอะซิติกเปลี่ยนเอทานอลต่อไปเป็นกรดอะซิติกและกรดอินทรีย์ชนิดอื่น ส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลคงเหลือลดลง โดย Wang *et al.* (2022) รายงานเพิ่มเติมว่าการใช้ประโยชน์จากน้ำตาลระหว่างการหมักมีความสัมพันธ์กับการสะสมของกรดอินทรีย์และการลดลงของค่า pH ซึ่งสอดคล้องกับผลการเปลี่ยนแปลงค่า pH ที่พบในการศึกษานี้ (Table 2 และ Table 3)

Table 1 Viscosity of various kombucha formulations during 14 days of fermentation.

Fermentation time (day)	Viscosity (centipoise; cP)				
	JTN	JT	T	J	S
0	1.31±0.01 ^{c,d,e}	1.31±0.03 ^{c,d,e}	1.08±0.01 ^{a,b,d,e}	1.50±0.01 ^{a,b,c,e}	1.05±0.01 ^{a,b,c,d}
5	1.65±0.02 ^{b,c,d,e}	1.77±0.02 ^{a,c,d,e}	1.18±0.01 ^{a,b,d,e,*}	1.93±0.02 ^{a,b,c,e}	1.11±0.01 ^{a,b,c,d}
7	1.97±0.02 ^{b,c,e,*}	2.06±0.02 ^{a,c,d,e,*}	1.14±0.01 ^{a,b,d,e}	1.96±0.01 ^{b,c,e,*}	1.11±0.01 ^{a,b,c,d}
14	1.75±0.02 ^{c,e}	1.80±0.03 ^{c,d,e}	1.14±0.00 ^{a,b,d,e}	1.76±0.02 ^{b,c,e}	1.18±0.01 ^{a,b,c,d,*}

Table 2 pH value of various kombucha formulations during 14 days of fermentation.

Fermentation time (day)	pH value				
	JTN	JT	T	J	S
0	5.90±0.08 ^{c,e}	5.83±0.06 ^{c,e}	5.08±0.04 ^{a,b,d,e}	5.90±0.04 ^{c,e}	6.52±0.03 ^{a,b,c,d}
5	5.62±0.03 ^{b,c,e}	3.93±0.10 ^{a,c,d,e}	3.41±0.04 ^{a,b,d,e}	5.64±0.05 ^{b,c,e}	2.96±0.04 ^{a,b,c,d}
7	5.51±0.02 ^{b,c,d,e}	3.59±0.04 ^{a,c,d,e}	2.92±0.03 ^{a,b,d}	3.81±0.04 ^{a,b,c,e}	2.85±0.03 ^{a,b,d}
14	5.32±0.03 ^{b,c,d,e,*}	3.44±0.03 ^{a,c,d,e,*}	2.73±0.04 ^{a,b,d,e,*}	3.74±0.05 ^{a,b,c,e,*}	2.55±0.05 ^{a,b,c,d,*}

Table 3 Total sugar content of various kombucha formulations during 14 days of fermentation.

Fermentation time (day)	Total sucrose content (%Brix)				
	JTN	JT	T	J	S
0	8.52±0.38 ^{c,d,e}	8.34±0.54 ^{c,d,e}	5.21±0.10 ^{a,b,d}	11.98±0.36 ^{a,b,c,e}	5.17±0.00 ^{a,b,d}
5	8.47±0.35 ^{c,e}	7.84±0.75 ^{c,e}	5.12±0.04 ^{a,b,d}	9.06±0.07 ^{c,e}	5.10±0.08 ^{a,b,d}
7	8.42±0.14 ^{b,c,e}	7.60±0.60 ^{a,c,e}	4.90±0.22 ^{a,b,d}	8.65±0.25 ^{c,e}	5.01±0.10 ^{a,b,d}
14	8.40±0.26 ^{b,c,e,*}	6.98±0.69 ^{a,c,d,e,*}	4.52±0.17 ^{a,b,d,*}	7.92±0.20 ^{b,c,e,*}	4.75±0.44 ^{a,b,d}

Note: Values are expressed as mean ± SD (n = 3). Different lowercase letters (a-e) within the same row indicate significant differences among formulations at the same fermentation time according to DMRT ($p < 0.05$). Asterisks (*) indicate significant differences between the baseline value (Day 0) and the highest or lowest response value observed within the same formulation, as determined by Student's *t*-test ($p < 0.05$).

2. Total phenolic contents (TPC) ในคอมบูชา

ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม (TPC) ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetry (Table 4) พบว่า ณ วันเริ่มต้น (day 0) คอมบูชาสูตร JT และ T มีค่า TPC เท่ากับ 1.65 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อมิลลิลิตร ซึ่งไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมสูตร JTN แต่สูงกว่าสูตร J อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ขณะที่กลุ่มควบคุมสูตร S ซึ่งประกอบด้วยซูโครสและ SCOBY มีค่า TPC ต่ำที่สุด (0.03 ± 0.00 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อมิลลิลิตร)

ระหว่างการหมัก พบว่าค่า TPC ของสูตร JT, T และ J มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในช่วงต้นของการหมักก่อนจะลดลงเล็กน้อยในช่วงปลายการหมัก โดยสูตร T มีค่า TPC สูงสุดเท่ากับ 1.76 ± 0.05 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อมิลลิลิตร ณ วันที่ 5

ซึ่งสูงกว่าสูตร JT (1.69 ± 0.05 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อมิลลิลิตร) และสูตร J (1.62 ± 0.01 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อมิลลิลิตร) ณ วันเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) อย่างไรก็ตาม สูตร JT และ J ยังคงมีค่า TPC ในระดับสูงตลอดระยะเวลาการหมัก (Figure 3a)

การเพิ่มขึ้นของ TPC ในช่วงต้นของการหมักอาจเกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ใน SCOBY ที่ผลิตเอนไซม์หลายชนิด เช่น cellulase, glucanase, xylanase และ glucosidase ซึ่งช่วยย่อยสลายสารประกอบพอลิฟีนอลโมเลกุลใหญ่และปลดปล่อยสารฟีนอลิกที่จับอยู่กับผนังเซลล์พืช ทำให้ตรวจวัดปริมาณสารฟีนอลิกรวมได้เพิ่มขึ้น (Aditiwati & Kusnadi, 2003; Wang *et al.*, 2022) ในทางตรงกันข้าม การลดลงของ TPC ในช่วงปลายของการหมักอาจเกี่ยวข้องกับการเกิดพอลิเมโร

เชชันหรือการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารฟีนอลิกบางชนิด ส่งผลให้ความสามารถในการตอบสนองต่อปฏิกิริยา Folin-Ciocalteu ลดลง (Romsomsa *et al.*, 2020)

ในใบชาสดประกอบด้วยสารพอลิฟีนอลจำนวนมาก โดยเฉพาะกลุ่ม flavanols ซึ่งมีคาเทชิน (catechins) เป็นองค์ประกอบหลักถึง 60–80% ของพอลิฟีนอลทั้งหมด โดยชนิดที่สำคัญ ได้แก่ (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), (-)-Epigallocatechin (EGC), (-)-Epicatechin-3-gallate (ECG) และ (-)-Epicatechin (EC) (Zhen *et al.*, 2002) นอกจากนี้ Cardoso *et al.* (2020) ยังรายงานว่าสารฟีนอลิกหลักในคอมบูชาชาดำคือ flavonoids รองลงมาคือ phenolic acids, polyphenols, lignans และ stilbenes ส่วนแกันเตวันมีสารออกฤทธิ์หลัก ได้แก่ chlorogenic acid และ dicaffeoylquinic acid ซึ่งเป็นสารในกลุ่มฟีนอลิกเช่นกัน โดย Showkat *et al.* (2019) รายงานปริมาณ TPC ของผงแกันเตวันแห้งเท่ากับ 0.9-1.4 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อกรัม ทั้งนี้ ค่า TPC ที่พบในงานวิจัยนี้มีแนวโน้มสูงกว่ารายงานก่อนหน้านี้ในคอมบูชาชาดำ ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วงประมาณ 0.90 - 1.09 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อมิลลิลิตร (Cardoso *et al.*, 2020; Hsieh *et al.*, 2021) ความแตกต่างดังกล่าวอาจเกิดจากชนิดของวัตถุดิบ สภาพการหมัก และองค์ประกอบของ SCOBY ที่ใช้ในแต่ละการศึกษา

สำหรับกลุ่มควบคุมสูตร S พบว่า ค่า TPC เพิ่มขึ้นจาก 0.03 ± 0.00 เป็น $0.32 - 0.39$ มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อมิลลิลิตรภายหลังการหมัก แม้ว่าจะยังต่ำกว่าสูตรอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่ผลดังกล่าวสะท้อนให้เห็นว่ากระบวนการหมักและ SCOBY อาจมีส่วนในการสร้างหรือปลดปล่อยสารที่ตอบสนองต่อการทดสอบ Folin-Ciocalteu ได้ รวมทั้งสารเมแทบอไลต์ที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสนับสนุนบทบาทของ SCOBY ต่อการเพิ่มคุณค่าทางชีวภาพของคอมบูชา (Jakubczyk *et al.*, 2020; das Chagas *et al.*, 2024)

3.ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในคอมบูชา

ผลการประเมินฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของคอมบูชาสูตรต่างๆ ด้วยวิธี DPPH radical scavenging (DPPH) และ Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) พบว่า คอมบูชาสูตร JT, T และ J มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในระดับสูงตลอดระยะเวลาการหมัก และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในช่วงต้นของการหมัก

ผลการทดสอบด้วยวิธี DPPH (Table 5, Figure 3b) พบว่า ณ วันเริ่มต้นการหมัก สูตร T มีค่า % inhibition สูงสุดเท่ากับ $93.55 \pm 0.89\%$ รองลงมาคือสูตร J, JT และ JTN ตาม

ลำดับ ขณะที่กลุ่มควบคุม S มีค่า % inhibition ต่ำที่สุด ($47.96 \pm 0.44\%$) ภายหลังการหมัก ค่า % inhibition ของสูตร JT, T และ J มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยสูตร JT มีค่าสูงสุดเท่ากับ $96.14 \pm 0.15\%$ ณ วันที่ 7 ซึ่งไม่แตกต่างจากสูตร T ($95.71 \pm 0.53\%$) ณ วันที่เดียวกัน แต่สูงกว่าสูตร J และ JTN นอกจากนี้ยังมีค่าสูงกว่าสารมาตรฐาน Trolox ($94.54 \pm 0.49\%$, ณ ความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ผลการศึกษาที่สอดคล้องกับรายงานของ Wang *et al.* (2022) ที่พบว่ากระบวนการหมักสามารถเพิ่มศักยภาพการต้านอนุมูลอิสระของคอมบูชาได้ โดยอาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบฟีนอลิกและการเกิดสารเมแทบอไลต์ที่มีฤทธิ์ชีวภาพระหว่างการหมัก อย่างไรก็ตาม แนวโน้มดังกล่าวแตกต่างจากรายงานของ Romsomsa *et al.* (2020) ที่พบว่าค่า % inhibition ลดลงเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น ซึ่งอาจเป็นผลมาจากชนิดของวัตถุดิบ สภาพการหมัก และองค์ประกอบของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา

สำหรับผลการทดสอบด้วยวิธี FRAP (Table 6, Figure 3c) พบว่า ณ วันเริ่มต้นการหมัก (day 0) สูตร JT, T และ JTN มีค่า FRAP เท่ากับ 23.24 ± 0.05 , 23.92 ± 1.20 และ 23.23 ± 2.90 มิลลิกรัมสมมูลเฟอร์รัสต่อมิลลิลิตรตามลำดับ โดยไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ขณะที่ทั้งสามสูตรมีค่า FRAP สูงกว่าสูตร J และสูตร S อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ระหว่างการหมัก ค่า FRAP ของสูตร JT, T และ JTN มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในช่วงต้นของการหมัก แล้วลดลงในวันที่ 14 โดยสูตร T มีค่า FRAP สูงที่สุด เท่ากับ 25.73 ± 0.56 มิลลิกรัมสมมูลเฟอร์รัสต่อมิลลิลิตร ณ วันที่ 7 รองลงมาคือสูตร JTN และ JT ซึ่งมีค่าเท่ากับ 24.76 ± 1.32 และ 24.12 ± 0.88 มิลลิกรัมสมมูลเฟอร์รัสต่อมิลลิลิตร ณ วันที่เดียวกัน ตามลำดับ ขณะที่สูตร J มีค่า FRAP สูงสุดเท่ากับ 24.24 ± 0.59 มิลลิกรัมสมมูลเฟอร์รัสต่อมิลลิลิตร ณ วันที่ 14 ส่วนกลุ่มควบคุมสูตร S แม้ค่า FRAP จะเพิ่มขึ้นหลังการหมักแต่ยังคงต่ำกว่าสูตรอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ตลอดการศึกษา

ค่า FRAP สะท้อนความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการรีดิวซ์เฟอร์ริกไอออน (Fe^{3+}) ให้เป็นเฟอร์รัสไอออน (Fe^{2+}) ดังนั้นค่า FRAP ที่สูงในสูตร JT, T และ J อาจสัมพันธ์กับการมีสารประกอบฟีนอลิกในชาดำและแกันเตวัน รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพภายใต้กิจกรรมของจุลินทรีย์ใน SCOBY ระหว่างการหมัก อย่างไรก็ตาม การลดลงของค่า FRAP ในสูตร JT และ T ช่วงปลายของการหมักอาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบหรือการเสื่อมสลายของสารต้านอนุมูลอิสระบางชนิด ส่งผลให้ความสามารถในการรีดิวซ์ลดลง

กลุ่มควบคุม JTN มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในระดับสูงตั้งแต่ก่อนการหมัก ทั้งจากผลการทดสอบ DPPH และ FRAP ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณสารฟีนอลิกรวมที่ตรวจวัดได้ สะท้อนถึงบทบาทของชาดำและแก่นตะวันในฐานะแหล่งสำคัญของสารต้านอนุมูลอิสระ ขณะที่กลุ่มควบคุม S มีค่า % inhibition เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนระหว่างการหมัก แต่ยังคงมีค่า FRAP ต่ำกว่าสูตรอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แสดงให้เห็นว่ากระบวนการหมักและ SCOBY อาจก่อให้เกิดสารเมแทบอไลต์บางชนิดที่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดี แต่มีความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริกไอออนค่อนข้างจำกัด

Jakubczyk *et al.* (2020) รายงานว่าจุลินทรีย์ใน SCOBY สามารถผลิตสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ เช่น lactic acid และ glucuronic acid ขณะที่ das Chagas *et al.* (2024) รายงานว่าใน SCOBY เป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถสกัดและตรวจวัดฤทธิ์ได้ด้วยวิธี FRAP, ABTS และ ORAC ผลการศึกษาดังกล่าวสนับสนุนบทบาทของ SCOBY ในการเสริมสร้างคุณสมบัติต้านออกซิเดชันของคอมบูชา และอาจเกี่ยวข้องกับการปลดปล่อยสารฟีนอลิกหรือการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพิ่มเติมระหว่างกระบวนการหมัก

เมื่อพิจารณาพร้อมกับผลการวิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกรวม พบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของคอมบูชาสูตร JT, T และ J มีความสัมพันธ์กับสารประกอบฟีนอลิกที่มีอยู่ในชาดำและแก่นตะวัน รวมถึงการเปลี่ยนแปลงของสารออกฤทธิ์ที่เกิดขึ้นระหว่างการหมัก โดยจุลินทรีย์ใน SCOBY อาจมีส่วนช่วยปลดปล่อยหรือสร้างสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพิ่มเติม ทำให้คอมบูชาทั้งสามสูตรมีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูงตลอดระยะเวลาการหมัก

ทั้งนี้ ความแตกต่างที่พบระหว่างผลการทดสอบ DPPH และ FRAP สะท้อนถึงความแตกต่างของกลไกการทดสอบในแต่ละวิธี เนื่องจาก DPPH ประเมินความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ขณะที่ FRAP ประเมินความสามารถในการรีดิวซ์สารออกซิไดซ์ ดังนั้นการใช้ทั้งสองวิธีร่วมกันจึงช่วยให้ประเมินศักยภาพต้านอนุมูลอิสระของคอมบูชาได้ครอบคลุมมากยิ่งขึ้น

แม้ว่าการศึกษานี้จะยังไม่สามารถประเมินค่า IC₅₀ ของแต่ละสูตรได้ แต่ค่า % inhibition ที่สูงของสูตร JT เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Trolox ภายใต้อาการทดลองเดียวกัน สะท้อนถึงศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระที่น่าสนใจ ทั้งนี้ การเปรียบเทียบประสิทธิภาพอย่างชัดเจนจำเป็นต้องอาศัยการคำนวณค่า IC₅₀ หรือค่าเทียบเท่า Trolox เพิ่มเติม

Table 4 Total phenolic contents of various kombucha formulations during 14 days of fermentation.

Fermentation time (day)	Total phenolic contents (mg GAE/mL Kombucha)				
	JTN	JT	T	J	S
0	1.65±0.01 ^{d,e}	1.65±0.00 ^{d,e}	1.65±0.00 ^{d,e}	1.59±0.00 ^{a,b,c,e}	0.03 ±0.00 ^{a,b,c,d}
5	1.65±0.03 ^e	1.69±0.05 ^{c,d,e}	1.76±0.0 ^{5b,d,e}	1.62±0.01 ^{b,c,e,*}	0.32±0.03 ^{a,b,c,d}
7	1.66±0.02 ^{b,d,e}	1.53±0.05 ^{a,e}	1.70±0.04 ^e	1.54±0.03 ^{a,e}	0.39±0.02 ^{a,b,c,d,*}
14	1.64±0.03 ^e	1.58±0.06 ^{c,d,e}	1.74±0.07 ^{b,d,e}	1.56±0.06 ^{b,c,e}	0.38±0.02 ^{a,b,c,d}

Table 5 Antioxidant activity of various kombucha formulations during 14 days of fermentation by DPPH assay.

Fermentation time (day)	% Inhibition				
	JTN	JT	T	J	S
0	88.81± 3.64 ^e	89.14±2.55 ^{d,e}	93.55±0.89 ^{d,e}	89.49 ±1.60 ^{b,c,e}	47.96 ±0.44 ^{a,b,c,d}
5	89.87±0.97 ^{b,c,e}	93.55±0.20 ^{a,d}	92.37±0.39 ^{d,e}	91.48 ±0.27 ^{b,c,e}	93.57 ±0.21 ^{a,c,d}
7	92.17±3.01	96.14±0.15 ^{d,e,*}	95.71±0.53 ^{d,*}	93.57 ±0.60 ^{b,c,e}	95.36 ±0.23 ^{b,d,*}
14	93.74±1.10	94.40±0.23	94.65±0.22	93.91 ±1.61 [*]	94.59 ±0.12

Table 6 Antioxidant activity of various kombucha formulations during 14 days of fermentation by FRAP assay.

Fermentation time (day)	FRAP value (mg Fe ²⁺ /mL)				
	JTN	JT	T	J	S
0	23.23±2.90 ^e	23.24±0.50 ^{d,e}	23.92±1.20 ^{d,e}	19.15±0.49 ^{b,c,e}	0.75±0.03 ^{a,b,c,d}
5	24.57±0.50 ^{d,e}	23.30±0.67 ^{d,e}	24.66±0.20 ^{d,e}	18.40±0.72 ^{a,b,c,e}	3.24±0.09 ^{a,b,c,d}
7	24.76±1.32 ^e	24.12±0.88 ^{c,e}	25.73±0.56 ^{b,d,e}	19.37±1.40 ^{c,e}	3.32±0.13 ^{a,b,c,d}
14	20.83±1.56 ^{d,e}	20.19±2.01 ^e	22.13±0.99 ^{d,e}	24.24±0.59 ^{a,c,e,*}	3.74±1.41 ^{a,b,c,d,*}

Note: Values are expressed as mean ± SD (n = 3). Different lowercase letters (a-e) within the same row indicate significant differences among formulations at the same fermentation time according to DMRT ($p < 0.05$). Asterisks (*) indicate significant differences between the baseline value (Day 0) and the highest or lowest response value observed within the same formulation, as determined by Student's *t*-test ($p < 0.05$).

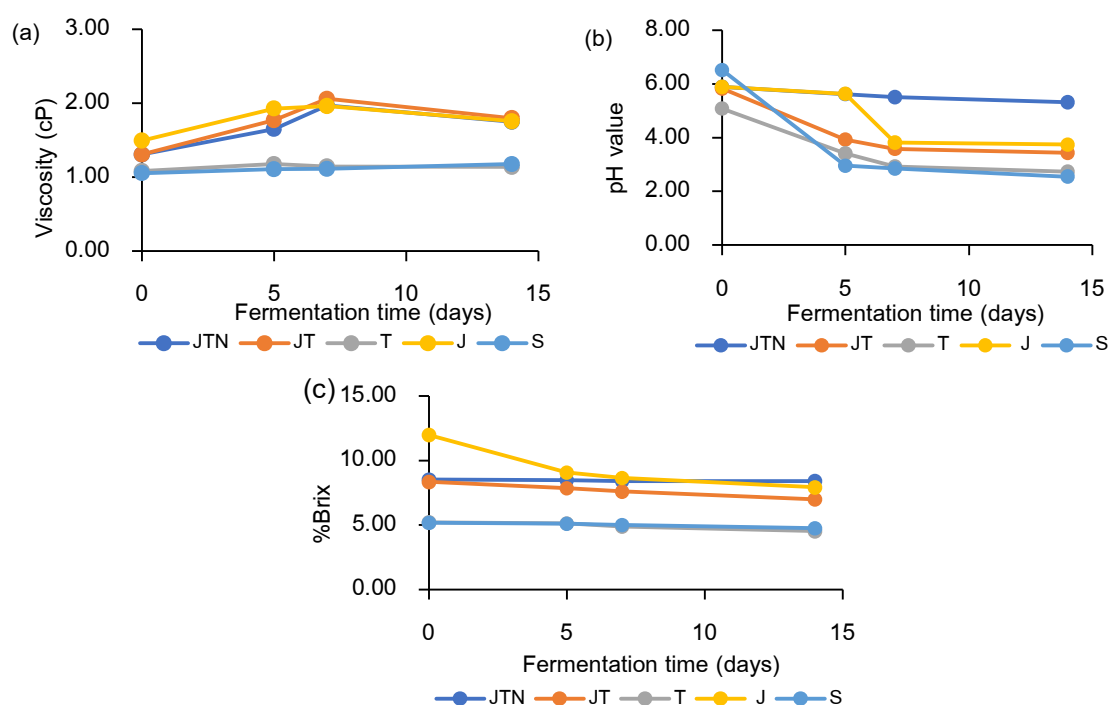


Figure 2 Changes in (a) Viscosity, (b) pH value and (c) Total sugar content for various kombucha formulations during 14-day of fermentation (JTN: unfermented black tea with Jerusalem artichoke, JT: fermented black tea with Jerusalem artichoke, T: fermented black tea, J: fermented Jerusalem artichoke, and S: fermented sucrose).

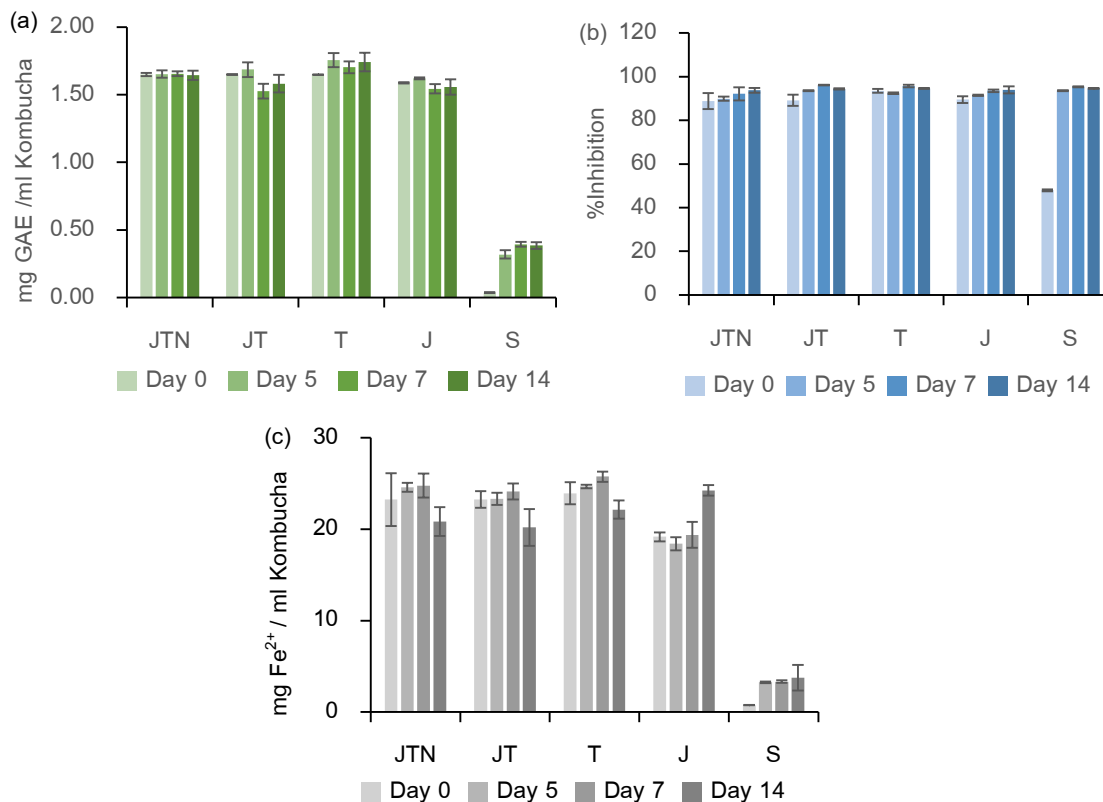


Figure 3 Changes in (a) total phenolic content, (b) anti-DPPH (%inhibition) and (c) FRAP value for various kombucha formulations during 14-day of fermentation.

สารต้านอนุมูลอิสระที่ตรวจพบในคอมบูชาส่วนใหญ่มีความสัมพันธ์กับสารประกอบพอลิฟีนอลที่พบในชาดำและแก่นตะวัน โดยเฉพาะสารในกลุ่ม flavonoids ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการต้านอนุมูลอิสระ (Zhen *et al.*, 2002; Showkat *et al.*, 2019) ทั้งนี้ Cardoso *et al.* (2020) รายงานว่าคอมบูชาชาดำมี flavonoids เป็นองค์ประกอบหลักของสารฟีนอลิก ขณะที่ผลการศึกษานี้พบว่าคอมบูชาทุกสูตรมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในระดับสูง ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมที่ตรวจวัดได้ นอกจากนี้ ค่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากการศึกษานี้ยังมีแนวโน้มสูงกว่าที่ Hsieh *et al.* (2021) รายงานไว้สำหรับคอมบูชาชาดำ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากความแตกต่างของวัตถุดิบ สภาพการหมัก และองค์ประกอบของ SCOBY ที่ใช้ในการผลิต

โดยภาพรวม ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าการหมักด้วย SCOBY ช่วยคงหรือเพิ่มศักยภาพการต้านอนุมูลอิสระของคอมบูชาที่ผลิตจากชาดำและแก่นตะวันได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งยังสอดคล้องกับแนวโน้มการพัฒนาคอมบูชาเพื่อเป็นเครื่องดื่มฟังก์ชันที่มีคุณค่าทางโภชนาการและให้สารออกฤทธิ์ชีวภาพสูง อย่างไรก็ตาม การผลิตคอมบูชาควรดำเนินการภายใต้หลักสุขลักษณะที่เหมาะสมและแนวทางการผลิตที่ปลอดภัย

เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพและปลอดภัยต่อผู้บริโภค (Jakubczyk *et al.*, 2022; Kitwetcharoen *et al.*, 2023)

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสามารถผลิตคอมบูชาจากชาดำผสมน้ำสกัดแก่นตะวัน (JT) โดยใช้ SCOBY เป็นหัวเชื้อหมักได้สำเร็จ การหมักเป็นเวลา 14 วันส่งผลให้สมบัติทางกายภาพและเคมีของผลิตภัณฑ์เปลี่ยนแปลงไป โดยเฉพาะการลดลงของค่า pH และการเปลี่ยนแปลงความหนืด ซึ่งสะท้อนถึงกระบวนการเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ระหว่างการหมัก

คอมบูชาสูตร JT, T และ J มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในระดับสูงตลอดระยะเวลาการหมัก โดยสูตร JT แสดงศักยภาพด้านการต้านอนุมูลอิสระไม่แตกต่างจากสูตร T และ J ในภาพรวม แม้ว่าสูตร T จะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมและค่าความสามารถในการรีดิวซ์สูงที่สุดในบางช่วงของการหมักก็ตาม ผลการทดสอบด้วยวิธี DPPH และ FRAP แสดงให้เห็นว่าการใช้น้ำสกัดแก่นตะวันร่วมกับชาดำสามารถคงคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของคอมบูชาไว้ได้

เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ผ่านการหมัก (JTN) พบว่ากระบวนการหมักมีส่วนสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์และฤทธิ์ชีวภาพ นอกจากนี้ กลุ่มควบคุมสูตร S ยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นภายหลังการหมัก แม้จะยังต่ำกว่าสูตรที่มีชาดำหรือแก่นตะวันเป็นส่วนประกอบ สะท้อนว่ากระบวนการหมักโดย SCOBY อาจมีส่วนในการสร้างสารเมแทบอไลต์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระบางชนิด โดยสรุป น้ำสกัดแก่นตะวันสามารถใช้ทดแทนชาดำบางส่วนในการผลิตคอมบูชาได้โดยไม่ส่งผลกระทบต่อศักยภาพการต้านอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์ อีกทั้งยังอาจเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการจากอินูลินและช่วยลดปริมาณชาดำในสูตร จึงมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นเครื่องดื่มฟังก์ชันเพื่อสุขภาพในอนาคต ทั้งนี้ ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ชีวภาพ ปริมาณแอลกอฮอล์ สัดส่วนที่เหมาะสมระหว่างชาดำและแก่นตะวัน การพัฒนาสูตรคอมบูชา น้ำตาลต่ำ ความคงตัวระหว่างการเก็บรักษา และการยอมรับของผู้บริโภค เพื่อสนับสนุนการพัฒนาและการประยุกต์ใช้ผลิตภัณฑ์ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยจากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร และหน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

เอกสารอ้างอิง

Aditiwati, P., & Kusnadi. (2003). Mixed culture and environmental factors involved in tea-cider fermentation. *Journal of Mathematical and Fundamental Sciences*, 35(2), 147–162. <https://doi.org/10.5614/itbj.sci.2003.35.2.5>

Amarasinghe, H., Weerakkody, N. S., & Waisundara, V. Y. (2018). Evaluation of physicochemical properties and antioxidant activities of kombucha “Tea Fungus” during extended periods of fermentation. *Food Science & Nutrition*, 6(3), 659–665.

Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70–76.

Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199–1200.

Cardoso, R. R., Neto, R. O., dos Santos D’Almeida, C. T., do Nascimento, T. P., Pressete, C. G., Azevedo, L., *et al.* (2020). Kombuchas from green and black teas have different phenolic profile, which impacts their antioxidant capacities, antibacterial and antiproliferative activities. *Food Research International*, 128, 108782.

das Chagas, E. G. L., Zamarian, F. C., de Souza, H. F., *et al.* (2024). Extraction of polyphenols and antioxidant compounds from SCOBY, as a by-product of Kombucha, using different types of extraction. *Discover Food*, 4, 54.

Gaggia, F., Baffoni, L., Galiano, M., Nielsen, D. S., Jakobsen, R. R., Castro-Mejía, J. L., *et al.* (2018). Kombucha beverage from green, black and rooibos teas: A comparative study looking at microbiology, chemistry and antioxidant activity. *Nutrients*, 11(1), 1–22.

Hsieh, Y., Chiu, M., & Chou, J. (2021). Efficacy of the kombucha beverage derived from green, black, and Pu’er teas on chemical profile and antioxidant activity. *Journal of Food Quality*, 2021, 1735959.

Jakubczyk, K., Kaldunska, J., Kochman, J., & Janda, K. (2020). Chemical profile and antioxidant activity of the kombucha beverage derived from white, green, black and red tea. *Antioxidants*, 9(5), 1–15.

Jakubczyk, K., Kupnicka, P., Melkis, K., Mielczarek, O., Walczyńska, J., Chlubek, D., & Janda-Milczarek, K. (2022). Effects of fermentation time and type of tea on the content of micronutrients in kombucha fermented tea. *Nutrients*, 14(22), 4828.

Jarrell, J., Altman, T., & Bennett, J. (2000). The kombucha consortia of yeasts and bacteria. *Mycologist*, 14, 166–170.

Kapp, J. M., & Sumner, W. (2019). Kombucha: A systematic review of the empirical evidence of human health benefit. *Annals of Epidemiology*, 30, 66–70.

Khan, N., & Mukhtar, H. (2018). Tea polyphenols in promotion of human health. *Nutrients*, 11(1), 1–16.

Kitwetcharoen, H., Phung, L. T., Klanrit, P., Thanonkeo, S., Tippayawat, P., Yamada, M., & Thanonkeo, P. (2023). Kombucha healthy drink—recent advances

- in production, chemical composition and health benefits. *Fermentation*, 9(1), 48.
- Niljantuk, N., Chuekram, S., Kangkuntod, S., Oonmetta-aree, J., & Singthong, J. (2019). Prebiotic activities of Jerusalem artichoke. *Science and Technology Research Journal Nakhon Ratchasima Rajabhat University*, 4(2), 18–28.
- Puttha, R., & Charoenphun, N. (2020). Planting techniques of Jerusalem artichoke in Thailand and guidelines for utilization of Jerusalem artichoke tubers in the food industry. *Thai Science and Technology Journal (TSTJ)*, 29(6), 919–940.
- Romsomsa, N., Pornsanthia, J., Rimlumduan, T., & Vechklang, K. (2020). The biological activities of Kombucha during fermentation process. *Naresuan Phayao Journal*, 14(1), 75–87.
- Sawicka, B., Skiba, D., Pszczółkowski, P., Aslan, I., Sharifi-Rad, J., & Krochmal-Marczak, B. (2020). Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) as a medicinal plant and its natural products. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-grand)*, 66(4), 160–177.
- Selvaraj, S., & Gurumurthy, K. (2024). Metagenomic, organoleptic profiling, and nutritional properties of fermented kombucha tea substituted with recycled substrates. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1367697.
- Shao, T., Yu, Q., Zhu, T., Liu, A., Gao, X., Long, X., *et al.* (2020). Inulin from Jerusalem artichoke tubers alleviates hyperglycaemia in high-fat-diet-induced diabetes mice through the intestinal microflora improvement. *British Journal of Nutrition*, 123(3), 308–318.
- Showkat, M. M., Falck-Ytter, A. B., & Strætkvern, K. O. (2019). Phenolic acids in Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.): Plant organ dependent antioxidant activity and optimized extraction from leaves. *Molecules*, 24(18), 3296.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152–178.
- Tomar, O. (2023). Determination of some quality properties and antimicrobial activities of kombucha tea prepared with different berries. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 47(2), 252–262.
- Wang, B., Rutherford-Markwick, K., Zhang, X.-X., & Mutukumira, A. N. (2022). Kombucha: Production and microbiological research. *Foods*, 11(21), 3456.
- Wang, X., Wang, D., Wang, H., Jiao, S., Wu, J., Hou, Y., Sun, J., & Yuan, J. (2022). Chemical profile and antioxidant capacity of kombucha tea by the pure cultured kombucha. *LWT*, 168, 113931.
- Watawana, M. I., Jayawardena, N., Gunawardhana, C. B., & Waisundara, V. Y. (2016). Enhancement of the antioxidant and starch hydrolase inhibitory activities of king coconut water (*Cocos nucifera* var. *aurantiaca*) by fermentation with kombucha 'tea fungus'. *International Journal of Food Science & Technology*, 51, 490–498.
- Zhen, Y., Chen, Z., Chen, S., & Chen, M. (2002). *Tea: Bioactivity and therapeutic potential*. Taylor & Francis.