การสำรวจเบื้องต้นของชนิดและสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดอะซิติก และแบคทีเรียกรดแลคติกในผลิตภัณฑ์คอมบูชาพร้อมดื่ม

วิภาวี วัฒนวิทย์

สารนิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาการชะลอวัยและฟื้นฟูสุขภาพ วิทยาลัยการแพทย์บูรณาการ
มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์
ปีการศึกษา 2564

A PRELIMINARY SURVEY OF GENUS AND SPECIES OF ACETIC ACID BACTERIA AND LACTIC ACID BACTERIA IN READY-TO-DRINK KOMBUCHA

VIPAWEE WATTANAVIT

A Thematic Paper Submitted in Partial Fulfillment of Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Anti-Aging and Regenerative Medicine

College of Integrative Medicine, Dhurakij Pundit University

Academic Year 2021

ใบรับรองสารนิพนธ์

วิทยาลัยการแพทย์บูรณาการ มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

หัวข้อสารนิพนธ์ การสำรวจเบื้องต้นของชนิดและสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดอะซิติกและแบคทีเรียกรดแลคติกในผลิตภัณฑ์คอมบูชาพร้อมดื่ม

เสนอโดย วิภาวี วัฒนวิทย์

สาขาวิชา วิทยาการชะลอวัยและฟื้นฟูสุขภาพ

กลุ่มวิชา วิทยาศาสตร์ชะลอวัยและฟื้นฟูสุขภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษาสารนิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกราช บำรุงพืชน์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดยคณะกรรมการสอบสารนิพนธ์แล้ว

ลงชื่อ .....ประธานกรรมการ

(เภสัชกรหญิง รองศาสตราจารย์ ดร.มยุรี ตันติสิระ)

ลงชื่อ .....กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาสารนิพนธ์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกราช บำรุงพืชน์)

ลงชื่อ .....กรรมการ

(ดร.นายแพทย์ภาวิต หน่อไชย)

วิทยาลัยการแพทย์บูรณาการ รับรองแล้ว

ลงชื่อ ..... คณบดีวิทยาลัยการแพทย์บูรณาการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นายแพทย์พัฒนา เด็งอำนวย)

วันที่ 21 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2565

หัวข้อสารนิพนธ์	การสำรวจเบื้องต้นของชนิดและสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดอะซิติกและแบคทีเรียกรดแลคติกในผลิตภัณฑ์คอมบูชาพร้อมดื่ม
ชื่อผู้เขียน	วิภาวี วัฒนวิทย์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.เอกราช บำรุงพืชน์
สาขาวิชา	วิทยาการชะลอวัยและฟื้นฟูสุขภาพ
ปีการศึกษา	2564

บทคัดย่อ

คอมบูชาคือเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพที่เกิดจากการหมักของน้ำชาหวานและหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ประกอบไปด้วยแบคทีเรียและยีสต์หลายชนิด คอมบูชาจึงถูกจัดให้เป็นเครื่องดื่มฟังก์ชันที่มีโปรไบโอติกส์ และได้รับความนิยมบริโภคเพิ่มมากขึ้นในกลุ่มคนรักสุขภาพ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจชนิดและสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดอะซิติกและแบคทีเรียกรดแลคติกในผลิตภัณฑ์คอมบูชาพร้อมดื่ม ผู้วิจัยทำการเก็บตัวอย่างคอมบูชาพร้อมดื่มที่วางจำหน่ายในร้านค้าจำหน่ายสินค้าเพื่อสุขภาพ และร้านค้าออนไลน์แบบเจาะจงจำนวน 6 ตัวอย่าง โดยเลือกตรายี่ห้อที่มีมาตรฐานการรับรองจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา 2 ตัวอย่าง และไม่มีการรับรองมาตรฐาน 4 ตัวอย่าง ส่งดำเนินการวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (BIOTEC) โดยใช้วิธีวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณตำแหน่งยีน 16S rRNA

จากการศึกษาพบว่าไม่พบแบคทีเรียกรดแลคติกในตัวอย่างคอมบูชาทั้ง 6 ตัวอย่าง และพบแบคทีเรียกรดอะซิติกในตัวอย่าง 4 ตัวอย่าง จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *Komagataeibacter, Acetobacter* และ *Gluconobacter* รวมทั้งสิ้น 7 สายพันธุ์ โดยจากการศึกษาคุณสมบัติของการเป็นโปรไบโอติกส์เท่าที่ผู้วิจัยสามารถค้นหาข้อมูลได้ในปัจจุบัน พบว่าแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ที่พบในการศึกษานี้ไม่มีคุณสมบัติของการเป็นโปรไบโอติกส์

อย่างไรก็ตามเครื่องดื่มคอมบูชายังถูกจัดว่าเป็นเครื่องดื่มฟังก์ชันที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย โดยประโยชน์ที่ได้รับมาจากองค์ประกอบทางเคมีที่หลากหลายที่ผลิตโดยเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ในกระบวนการหมัก รวมถึงประโยชน์จากวัตถุดิบที่ใช้ในการหมัก เช่น ใบชา สมุนไพร และเครื่องเทศ นอกจากนี้ยังได้รับประโยชน์จากค่า pH ในคอมบูชาที่เหมาะสำหรับการช่วยย่อยอาหารอีกด้วย ผู้บริโภคควรเลือกซื้อผลิตภัณฑ์คอมบูชาจากผู้ผลิตที่มีความรู้และน่าเชื่อถือ ใน

ขณะเดียวกัน ทางฝั่งผู้ผลิตควรใช้กระบวนการการผลิตที่มีคุณภาพและได้มาตรฐาน มีฉลากบรรจุภัณฑ์ที่ระบุรายละเอียดชัดเจนเกี่ยวกับวันผลิต วันหมดอายุ วัตถุดิบที่ใช้ และระยะเวลาในการหมัก เป็นต้น

คำสำคัญ: คอมบูชา, จุลินทรีย์, โปรไบโอติกส์, แบคทีเรีย, ยีสต์

DPU

Thematic Paper Title	A PRELIMINARY SURVEY OF GENERA AND SPECIES OF ACETIC ACID BACTERIA AND LACTIC ACID BACTERIA IN READY-TO-DRINK KOMBUCHA
Author	Vipawee Wattanavit
Thematic Paper Advisor	Asst. Prof. Dr.Akkarach Bumrungpert
Department	Anti-aging and Regenerative Medicine
Academic Year	2021

Abstract

Kombucha is a fermented beverage made from sugared tea and symbiotic culture of several bacteria and yeasts. Considered a functional drink with its content of probiotics, kombucha has become more popular amongst health-conscious consumers. The purpose of this study is to investigate the genera and the species of acetic acid bacteria and citric acid bacteria in ready-to-drink kombucha. Six samples of kombucha brands were collected from online stores and health food stores in Bangkok. Two samples had standard certifications from the Food and Drug Administration while the other four did not. All samples were studied at The National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC)'s laboratory using the 16S rRNA Sequencing of Culturable Bacteria analysis method.

The results from the BIOTEC analysis revealed that no lactic acid bacterium was found in all samples. Three genera of acetic acid bacteria found in four samples were *Komagataeibacter, Acetobacter* and *Gluconobacter*, from which 7 species were identified. To the best of my knowledge, no study has reported probiotic potentials of any of these species.

Despite the finding, kombucha is still considered a functional beverage since it is composed of several beneficial biochemical structures from raw ingredients used and from metabolites produced by bacteria and yeasts in the fermentation process. Furthermore, the low pH of the fermented drink is favorable to human digestion; however, consumers should select kombucha made by trustworthy and knowledgeable producers. On the other hand, producers should employ standardized procedure to ensure high quality and state all useful and necessary information

clearly on the labels such as manufacturing and expiry date, the duration of fermentation, raw materials and ingredients used.

Keywords: Kombucha, microorganism, probiotics, bacteria, yeast

DPU

กิตติกรรมประกาศ

สารนิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้อย่างสมบูรณ์โดยได้รับความช่วยเหลือและคำแนะนำอย่างดียิ่งจากคณาจารย์ และบุคลากรหลายฝ่าย ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. เอกราช บำรุงพืชน์ อาจารย์ที่ปรึกษา ที่ได้กรุณาสละเวลาอันมีค่ายิ่งในการให้คำปรึกษาและแนะนำแนวทางที่เป็นประโยชน์ต่อการทำวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบสารนิพนธ์ทุกท่านที่ได้กรุณาเสนอแนะข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ในการปรับปรุง และแก้ไขสารนิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอบคุณเจ้าหน้าที่หลักสูตรสาขาวิทยาการชะลอวัยและฟื้นฟูสุขภาพ มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์ที่ช่วยเหลือ อำนวยความสะดวก และประสานงานในทุกขั้นตอนจนสารนิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สุดท้ายนี้คุณประโยชน์อันพึงได้จากสารนิพนธ์ฉบับนี้ผู้วิจัยขอมอบให้เพื่อตอบแทนคุณบิดา มารดา และครอบครัวรวมถึงคณาจารย์ผู้มีพระคุณและกัลยาณมิตรทุกท่าน

วิภาวี วัฒนวิทย์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ
กิตติกรรมประกาศ..... ช
สารบัญตาราง..... ญ
สารบัญภาพ..... ฎ
บทที่
1. บทนำ.....1
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา..... 1
1.2 Gap of Knowledge 3
1.3 คำถามการวิจัย..... 3
1.4 วัตถุประสงค์การวิจัย..... 3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....3
1.6 ขอบเขตงานวิจัย..... 4
1.7 กรอบแนวในการวิจัย.....4
1.8 นิยามศัพท์เฉพาะในการวิจัย 4
2. แนวคิด ทฤษฎี และผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 5
2.1 คอมบูชา.....5
2.2 ปัจจัยที่ส่งผลต่อความหลากหลายของชนิดและสายพันธุ์แบคทีเรียในคอมบูชา..... 16
2.3 วิธีวิเคราะห์ชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย..... 16
2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 16
3. ระเบียบวิธีวิจัย 20
3.1 รูปแบบงานวิจัย..... 20
3.2 ประชากรและตัวอย่าง..... 20
3.3 เกณฑ์การคัดเลือก..... 20
3.4 ขั้นตอนการศึกษาวิจัย..... 21
3.5 วิธีการทดสอบวิจัย..... 21
3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล..... 21

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ **หน้า**

3.7 สถานที่ทำการวิเคราะห์.....21

4. ผลการศึกษาวิเคราะห์..... 22

4.1 ข้อมูลทั่วไปของตัวอย่างเครื่องดื่มคอมบูชาที่ใช้ทำการวิเคราะห์..... 22

4.2 ผลการวิเคราะห์ชนิดและสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดอะซิติกและ..... 25
แบคทีเรียกรดแลคติกในผลิตภัณฑ์คอมบูชาพร้อมดื่ม

5. อภิปรายผลการทดลอง สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ.....27

5.1 อภิปรายผลการทดลอง.....27

5.2 สรุปผลการวิจัย..... 31

5.3 ข้อเสนอแนะ..... 32

บรรณานุกรม.....35

ภาคผนวก..... 40

ประวัติผู้เขียน..... 51

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่

2.1 องค์ประกอบทางเคมีทั่วไปในน้ำหมักคอมบูชา.....8
2.2 ประโยชน์และคุณสมบัติของแบคทีเรียที่พบในคอมบูชา.....11
2.3 คุณสมบัติทางชีวภาพของคอมบูชา – งานวิจัยในหลอดทดลอง.....14
2.4 ชนิดของแบคทีเรียและระดับความชุกชุมสัมพัทธ์ ในตัวอย่างคอมบูชา
ที่หมักจากตัวอย่างหัวเชื้อจาก 5 แหล่ง.....19
4.1 ข้อมูลทั่วไปของตัวอย่างเครื่องดื่มคอมบูชาที่ใช้ศึกษาในงานวิจัยทั้งหมด 6 ตัวอย่าง.....22
4.2 แสดงภาพลักษณะตัวอย่าง.....23
4.3 ผลวิเคราะห์ การระบุชนิดและสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างคอมบูชา
โดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณตำแหน่งยีน 16S rRNA.....26

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

1.1 กรอบแนวคิด....4

2.1 กระบวนการหมักคอมบูชา....7

2.2 ชนิดของแบคทีเรียและระดับความชุกชุมสัมพัทธ์ในตัวอย่างคอมบูชาที่ใช้ชาเขียว และชาดำในการหมัก....18

4.1 แสดงสีและความขุ่นของตัวอย่างเครื่องดื่มคอมบูชา....25

DPU

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันการดูแลสุขภาพให้มีความสมบูรณ์ แข็งแรง และการป้องกันการเกิดโรคต่างๆ ถือว่าเป็นกระแสหลักของสังคม การรับประทานอาหารที่มีคุณสมบัติในการช่วยส่งเสริมสุขภาพ หรือที่เรียกว่า อาหารฟังก์ชัน (functional food) จึงเข้ามามีบทบาทมากขึ้น เครื่องดื่มคอมบูชาถูกจัดว่าเป็นอาหารฟังก์ชันที่กำลังได้รับความนิยมมากขึ้นเพราะมีคุณประโยชน์หลายประการที่ได้จากการหมักของใบชาและจุลินทรีย์ คอมบูชาถูกจัดว่าเป็นอาหารฟังก์ชันทางเลือกในการเสริมโปรไบโอติกส์ให้กับผู้ที่เป็นมังสวิรัติ และผู้ที่มีอาการแพ้น้ำตาลแลคโตส (lactose intolerance) ผู้ที่แพ้โปรตีนในนมวัว และผลิตภัณฑ์จากนมวัว และเนื่องจากคอมบูชามีปริมาณน้ำตาลที่ต่ำ มีรสชาติหวานเล็กน้อย มีความเปรี้ยว ซ่าส์ และให้ความรู้สึกสดชื่น จึงได้รับความนิยมในการบริโภคเพื่อทดแทนเครื่องดื่มประเภทน้ำหวาน น้ำอัดลม และเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ กระแสความนิยมดื่มคอมบูชาเกิดขึ้นทั่วโลก โดยเฉพาะในประเทศสหรัฐอเมริกาที่มีรายงานยอดขายเครื่องดื่มคอมบูชาในปี พ.ศ. 2562 ว่ามีมูลค่าถึง 1.67 พันล้านเหรียญสหรัฐอเมริกา และยังมีการคาดการณ์การเติบโตของยอดขายจนถึงปี พ.ศ. 2570 อยู่ที่ 19.7% ต่อปี[1] มีการกำหนดให้วันที่ 21 กุมภาพันธ์ของทุกปีเป็นวันคอมบูชาโลก[2] สำหรับในประเทศไทยมีการจัดตั้งสังคมออนไลน์ เช่น เฟซบุ๊คกลุ่ม “Kombucha and Fermented Beverage in Thailand” ซึ่งมีผู้ติดตามมากถึง 2.5 หมื่นคน เพื่อแลกเปลี่ยนความรู้เกี่ยวกับประโยชน์ วิธีการหมักคอมบูชา รวมถึงการแจกหัวเชื้อคอมบูชา และอุปกรณ์ในการหมัก และเฟซบุ๊คกลุ่ม “Kombucha and Fermented Beverage Marketplace in Thailand” ที่มีสมาชิกถึง 5.1 พันคน มีวัตถุประสงค์เพื่อการซื้อ ขาย อุปกรณ์ และวัตถุดิบที่ใช้ในการหมักคอมบูชา นอกจากนี้ยังมีผู้จัดหลักสูตรอบรมวิธีการหมักคอมบูชาสำหรับผู้ที่ต้องการหมักเพื่อบริโภคในครัวเรือน รวมถึงหลักสูตรสำหรับการผลิตเพื่อการจำหน่าย ทำให้มีผู้ผลิตคอมบูชาจากเดิมที่ผลิตเพื่อบริโภคในครัวเรือนมาผลิตเพื่อการจำหน่ายมากขึ้นทั้งการผลิตในภาคครัวเรือนและในภาคอุตสาหกรรม โดยปัจจุบันในประเทศไทยมีผลิตภัณฑ์คอมบูชาพร้อมดื่มมากกว่า 80 ยี่ห้อวางจำหน่ายในท้องตลาดผ่านช่องทางต่างๆ เช่น ร้านค้าออนไลน์ ร้านค้าสะดวกซื้อ และร้านค้าจำหน่ายสินค้าเพื่อสุขภาพ

คอมบูชามีองค์ประกอบทางชีวภาพ และองค์ประกอบทางเคมีที่หลากหลายทั้งที่ได้จากใบชาและที่ได้จากกระบวนการหมักของแบคทีเรียและยีสต์ ทำให้มีการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและมีการศึกษาวิจัยในสัตว์ทดลอง พบว่าคอมบูชามีฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง ต้านอนุมูลอิสระ ต้านจุลชีพก่อโรค ต้านเชื้อรา ปกป้องตับ ช่วยตับ ไต และลำไส้ในการขับสารพิษออกจากร่างกาย ปกป้องระบบทางเดินอาหาร รักษาสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ ทำให้ผนังลำไส้แข็งแรง[3] เป็นต้น

จากการศึกษาวิจัยถึงประโยชน์ต่อสุขภาพของโปรไบโอติกส์ในช่วงกว่าทศวรรษที่ผ่านมาทำให้ผู้คนตระหนักรู้ถึงความสำคัญของการบริโภคผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและอาหารหมักที่มีโปรไบโอติกส์มากขึ้น เช่น ประโยชน์ในด้านการจัดการกับจุลชีพก่อโรคโดยการแข่งขันแย่งกันเกาะตัวที่ผนังลำไส้ เพิ่มความแข็งแรงให้กับผนังลำไส้[4] ช่วยดูดซึมวิตามินและแร่ธาตุ ช่วยย่อยอาหาร เสริมภูมิต้านทาน ผลิตสารสื่อประสาท สารชีวเคมีต่างๆ เช่น วิตามิน และกรดไขมันสายสั้น (Short-chain fatty acids)[5] มีความสำคัญต่อการทำงานร่วมกันของระบบทางเดินอาหาร ระบบประสาท และสมอง (gut-brain axis)[6] มีการใช้โปรไบติกส์เพื่อการป้องกันรักษาโรคและแก้ไขปัญหาสุขภาพที่หลากหลาย เช่น โรคติดเชื้อทางเดินอาหาร โรคลำไส้แปรปรวน โรคภูมิแพ้ โรคติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ โรคปอดเรื้อรัง โรคทางจิตเวช มะเร็งชนิดต่างๆ ช่วยลดผลข้างเคียงจากการใช้ยาปฏิชีวนะ[4] และอื่นๆอีกมากมายทั้งที่มีการศึกษาวิจัยแล้ว และที่อยู่ในระหว่างการศึกษาเพิ่มเติม คอมบูชาให้ประโยชน์ต่อสุขภาพเนื่องจากเป็นแหล่งของแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์โดยกลุ่มแบคทีเรียที่พบมากที่สุดในคอมบูชาคือแบคทีเรียกรดอะซิติกและรองลงมาคือแบคทีเรียกรดแลคติก จากการศึกษาชนิดและสายพันธุ์ของแบคทีเรียในตัวอย่างคอมบูชาที่แตกต่างกัน พบว่ามีแบคทีเรียชนิดหลักที่เหมือนกัน แต่ก็ยังพบว่ามีความแตกต่างของชนิดและสายพันธุ์แบคทีเรียด้วยเช่นกัน ซึ่งปัจจัยที่ส่งผลต่อความหลากหลายนี้ ได้แก่ แหล่งที่มาของหัวเชื้อ ระยะเวลาในการหมัก[7] ค่า pH[8] อุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก[3,7] ฯลฯ โดยความแตกต่างของชนิดและสายพันธุ์แบคทีเรียในคอมบูชานี้อาจส่งผลให้เครื่องดื่มคอมบูชามีคุณสมบัติและคุณภาพที่แตกต่างกัน และคอมบูชาที่ได้จากล็อตการผลิตเดียวกันมักจะมีคุณภาพที่ไม่สม่ำเสมอตลอดเวลา จากการศึกษาวิจัยในคอมบูชาก่อนหน้านี้พบว่ามีแบคทีเรียบางสายพันธุ์เท่านั้นที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกส์ โดยส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียกลุ่มกรดแลคติก เช่น บางสายพันธุ์ของแบคทีเรีย *Lactobacillus*[9] และ *Pediococcus*[10] และสายพันธุ์เหล่านี้สามารถพบได้ในคอมบูชาเพียงบางตัวอย่างเท่านั้น

อย่างไรก็ตาม ผลิตภัณฑ์คอมบูชาพร้อมดื่มที่วางจำหน่ายในท้องตลาดประเทศไทยส่วนใหญ่กล่าวอ้างว่ามีโปรไบโอติกส์ แต่ไม่ได้ระบุชนิดและสายพันธุ์ของแบคทีเรียบนฉลากเครื่องดื่ม

ทำให้ผู้บริโภคไม่อาจทราบข้อมูลที่บ่งบอกถึงคุณภาพในด้านของการเป็นเครื่องดื่มที่มีคุณสมบัติของโปรไบโอติกส์ได้ จึงเป็นที่มาของการสำรวจหาชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียในเครื่องดื่มคอมบูชาพร้อมดื่มที่วางจำหน่ายในท้องตลาดประเทศไทย เพื่อเป็นประโยชน์ต่อผู้บริโภคในการเลือกซื้อและบริโภคผลิตภัณฑ์คอมบูชา และเพื่อเป็นประโยชน์ต่อผู้ผลิตในการพัฒนาคุณภาพและมาตรฐานการผลิตเครื่องดื่มคอมบูชาต่อไปในอนาคต

1.2 Gap of Knowledge

เนื่องจากในคอมบูชามีแบคทีเรียบางชนิดเท่านั้นที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกส์ และชนิดและสายพันธุ์ของแบคทีเรียในคอมบูชามักมีความแตกต่างกันไปเสมอในแต่ละตัวอย่าง

อย่างไรก็ตาม ผลิตภัณฑ์คอมบูชาพร้อมดื่มที่วางจำหน่ายในท้องตลาดไทยส่วนใหญ่มักใช้คำกล่าวอ้างว่ามีโปรไบโอติกส์ แต่ไม่ระบุชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียบนฉลากผลิตภัณฑ์ ซึ่งถือว่าไม่มีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ในการพิสูจน์คำกล่าวอ้างนี้

ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาชนิดและสายพันธุ์ของแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์คอมบูชาที่วางจำหน่ายในประเทศไทย เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานที่เป็นประโยชน์ต่อผู้บริโภค

1.3 คำถามการวิจัย

ผลิตภัณฑ์คอมบูชาพร้อมดื่มที่วางจำหน่ายในประเทศไทยแต่ละยี่ห้อมีความแตกต่างกันของชนิดและสายพันธุ์แบคทีเรียหรือไม่ อย่างไร และมีแบคทีเรียชนิดและสายพันธุ์ใดได้บ้าง

1.4 วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาชนิดและสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดอะซิติกและแบคทีเรียกรดแลคติกในผลิตภัณฑ์คอมบูชาพร้อมดื่มที่วางจำหน่ายในประเทศไทย

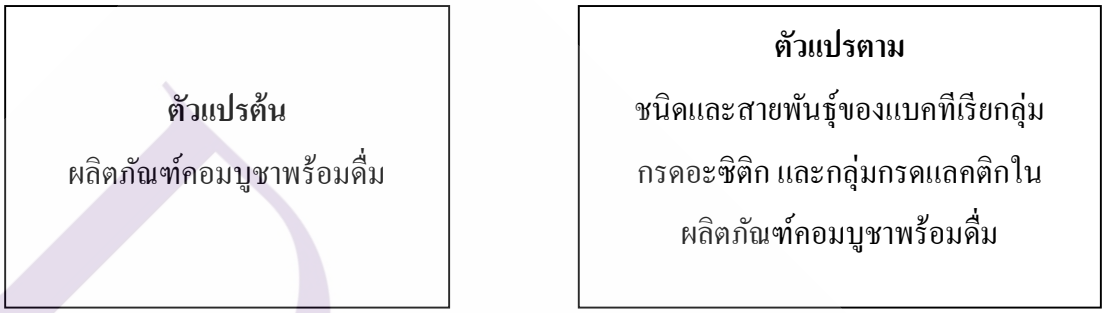
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานที่เป็นประโยชน์ต่อผู้บริโภค และเพื่อเป็นประโยชน์ต่อผู้ผลิตในการพัฒนาคุณภาพและมาตรฐานการผลิตเครื่องดื่มคอมบูชาต่อไปในอนาคต

1.6 ขอบเขตงานวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการสำรวจชนิดและสายพันธุ์กลุ่มแบคทีเรียกรดอะซิติก (Acetic Acid Bacteria) และแบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic Acid Bacteria) ในเครื่องดื่มคอมบูชาพร้อมดื่มที่วางจำหน่ายตามร้านสะดวกซื้อ และช่องทางจัดจำหน่ายออนไลน์ต่างๆในประเทศไทย

1.7 กรอบแนวคิดการวิจัย



ภาพที่ 1.1 กรอบแนวคิดการวิจัย

1.8 นิยามศัพท์เฉพาะในการวิจัย

1. คอมบูชา หมายถึง เครื่องดื่มชาหมักเพื่อสุขภาพ ที่เกิดจากกระบวนการหมักตามธรรมชาติ โดยวัตถุดิบหลักที่ใช้หมัก คือ หัวเชื้อคอมบูชาที่เกิดจากการหมักผลไม้รสเปรี้ยว ใบชา และน้ำตาล
2. แบคทีเรีย หมายถึง สิ่งมีชีวิตเซลล์เดียว ไม่มีผนังห่อหุ้มนิวเคลียส มีรูปร่างกลมเป็นท่อน โค้ง หรือเป็นเกลียว
3. โปรไบโอติกส์ หมายถึง จุลินทรีย์มีชีวิตจำพวกแบคทีเรียและยีสต์ที่ดีและเป็นประโยชน์ต่อร่างกาย ซึ่งเมื่อบริโภคเข้าไปในปริมาณที่เหมาะสมจะส่งผลให้มีสุขภาพดี

บทที่ 2

แนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

งานวิจัยนี้ เป็นการสำรวจชนิดและสายพันธุ์ของแบคทีเรียชนิดที่ดีในผลิตภัณฑ์คอมบูชาพร้อมดื่มที่วางจำหน่ายในท้องตลาดประเทศไทย โดยผู้วิจัยได้ทบทวนแนวคิด ทฤษฎี ตลอดจนงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ดังต่อไปนี้

2.1 คอมบูชา

2.2 ปัจจัยที่ส่งผลต่อความหลากหลายของชนิดและสายพันธุ์แบคทีเรียในคอมบูชา

2.3 วิธีวิเคราะห์ชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 คอมบูชา

2.1.1 ความหมายและที่มา

คอมบูชา คือ เครื่องดื่มชาหมักที่มีรสชาติเปรี้ยวนำ มีรสหวานเล็กน้อย มีความซ่า ให้ความรู้สึกสดชื่นเมื่อดื่ม มีถิ่นกำเนิดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศจีน (แมนจูเรีย) เมื่อประมาณ 220 ปีก่อนคริสตศักราช หรือในสมัยราชวงศ์ฉิน นิยมบริโภคเพื่อช่วยล้างพิษ และช่วยให้มีร่างกายแข็งแรงมีกำลังวังชา ในปี ค.ศ. 414 นายแพทย์คอมบู (Kombu) ได้นำน้ำหมักนี้เข้าไปยังประเทศญี่ปุ่น และได้ใช้รักษาพระอาการประชวรเกี่ยวกับระบบขับถ่ายของจักรพรรดิอินเกียว จากการขยายตัวของเส้นทางการค้าจากทวีปเอเชียสู่ทวีปยุโรป คอมบูชาได้ถูกนำไปใช้อย่างแพร่หลายในประเทศต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นประเทศรัสเซีย ประเทศในแถบยุโรปตะวันออก ในช่วงศตวรรษที่ 20 ได้มีการบริโภคคอมบูชาในประเทศเยอรมัน ฝรั่งเศส และในทวีปแอฟริกาเหนือที่ปกครองโดยฝรั่งเศส ระหว่างปี ค.ศ. 1550-1560 ในประเทศอิตาลี ได้มีการตั้งกลุ่มคนที่นิยมและรักการดื่มคอมบูชา เรียกว่า กลุ่มฟังโก้ไชนีส (Funkochinese) และได้มีนักวิจัยชาวสวิสเซอร์แลนด์ที่ได้ทำการศึกษาและรายงานว่าการดื่มคอมบูชาให้ประโยชน์ต่อสุขภาพเหมือนกับการรับประทานโยเกิร์ต จึงทำให้คอมบูชาได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้น ในปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มคอมบูชาจำหน่ายทั่วโลกทั้ง

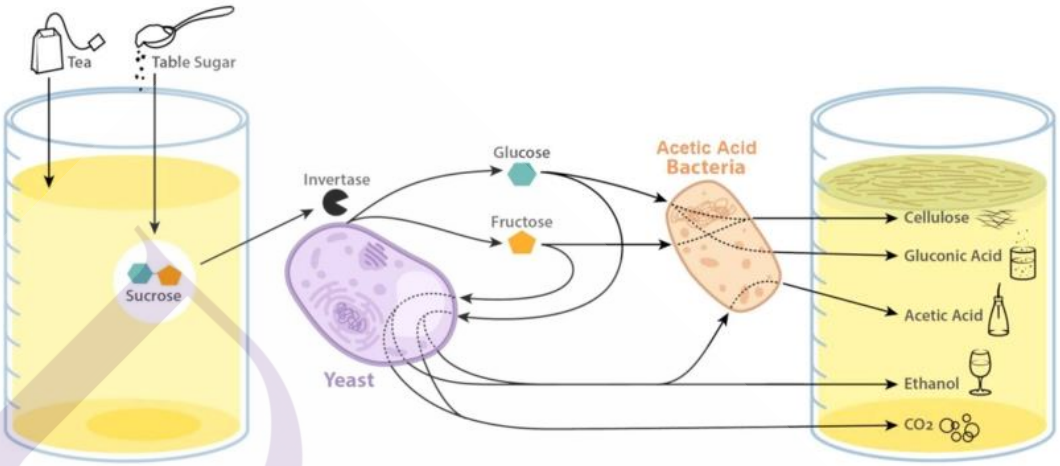
ในร้านค้าปลีกและร้านค้าออนไลน์ โดยมีจำหน่ายหลายรสชาติ รวมถึงมีการจำหน่ายหัวเชื้อคอมบูชาที่สามารถสั่งซื้อผ่านทางช่องทางออนไลน์ได้อีกด้วย[8]

2.1.2 กระบวนการหมัก

คอมบูชาเกิดจากการหมักของน้ำชาหวาน และหัวเชื้อคอมบูชา หรือ *SCOBY* (Symbiotic Cultures of Bacteria and Yeast) มีลักษณะเป็นวุ้นเซลลูโลสซึ่งเกิดจากการทำงานร่วมกันของแบคทีเรียและยีสต์ที่อยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัย โดยแบคทีเรียที่พบในหัวเชื้อคอมบูชาส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียกรดอะซิติก (acetic acid bacteria) ในขณะที่แบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria) สามารถพบได้ในหัวเชื้อเพียงบางตัวอย่าง หัวเชื้อคอมบูชาเกิดจากการหมักผลไม้ที่มีรสเปรี้ยวกับน้ำตาลทราย ใบชาที่ใช้หมักเป็นพืชตระกูล *Camellia Sinensis* โดยชนิดของใบชาที่นิยมใช้ ได้แก่ ชาดำ ชาเขียว ชาขาว และชาอู่หลง

จากการศึกษาวิจัยส่วนใหญ่ วิธีการหมักคอมบูชาจะนิยมใส่ใบชาลงไปในน้ำร้อนที่มีอุณหภูมิเริ่มต้นที่ประมาณ 70-95 องศาเซลเซียส แช่ใบชาทิ้งไว้ประมาณ 5-15 นาที แล้วจึงกรองใบชาออก จากนั้นเติมน้ำตาลทรายปริมาณ 50-100 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็นในอุณหภูมิห้อง แล้วจึงเติมหัวเชื้อคอมบูชาลงไป หัวเชื้อคอมบูชาแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่เป็นน้ำชาหมัก และส่วนที่เป็นวุ้นเซลลูโลส โดยในการหมักสามารถใช้หัวเชื้อเพียงส่วนใดส่วนหนึ่ง หรือใส่ทั้งสองส่วนก็ได้ ซึ่งลำดับขั้นตอนในการเตรียมการหมัก ปริมาณและชนิดของวัตถุดิบที่ใช้อาจมีความแตกต่างกันไปได้บ้างตามความต้องการและประสบการณ์ของแต่ละบุคคล หลังจากนั้นกระบวนการหมักจะเริ่มต้นขึ้น จากภาพที่ 2.1 ที่อุณหภูมิห้อง ยีสต์จะเริ่มทำงานโดยการย่อยน้ำตาลซูโครสให้เป็นน้ำตาลเชิงเดี่ยว คือ กลูโคสและฟรุคโตส และถูกย่อยต่อโดยยีสต์ให้เป็นเอทานอลและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ จากนั้นแบคทีเรียกรดอะซิติกจะใช้เอทานอล และน้ำตาลกลูโคสที่ยีสต์ได้ย่อยไว้แล้วในการสร้างกรดอะซิติก กรดกลูโคนิก และกรดอินทรีย์อื่นๆ ซึ่งกรดอินทรีย์ต่างๆ เหล่านี้ทำให้น้ำหมักมีค่า pH ลดลง อยู่ที่ประมาณ 3 ซึ่งค่าความเป็นกรดระดับนี้ช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลชีพก่อโรคในกระบวนการหมักได้ ในขณะเดียวกันแผ่นวุ้นเซลลูโลส หรือแผ่นไบโอฟิล์ม (biofilm) ก็ถูกสร้างขึ้นที่บริเวณผิวน้ำจากการทำงานร่วมกันของยีสต์ และแบคทีเรียกรดอะซิติกสายพันธุ์ *komagataeibacter xylinus* ในกระบวนการผลิตในอุตสาหกรรมเพื่อการจำหน่ายเครื่องดื่มคอมบูชา แผ่นไบโอฟิล์มและชิ้นส่วนเล็กๆจะถูกแยกและกรองออกก่อนการบรรจุขวด หลังจากการบรรจุขวดกระบวนการสร้างไบโอฟิล์มนี้จะหยุดลงเนื่องจากแบคทีเรียกรดอะซิติกขาดออกซิเจนในการทำงาน เพราะฉะนั้นหากต้องการให้แบคทีเรียหยุดผลิตกรดอะซิติกเพื่อการควบคุมรสชาติให้ได้ตามที่ต้องการก็สามารถทำได้โดยการใช้ภาชนะปิดสนิท ซึ่งในขณะเดียวกันสภาพแวดล้อมแบบปิดนี้ก็จะเอื้อยีสต์ในการผลิตเอทานอล และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ทำให้ได้

เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ต่ำที่มีความเปรี้ยวและความซ่า อย่างไรก็ตาม ค่า pH ในระดับที่ยอมรับได้ของเครื่องดื่มคอมบูชา ไม่ควรต่ำกว่า 3 มิฉะนั้นแล้วจะมีความเป็นกรดและมีกลิ่นเฉพาะของกรดอะซิติกที่มากเกินไป ทำให้รสชาติที่ได้มีความเปรี้ยวมาก และรับประทานยาก[11]



ภาพที่ 2.1 กระบวนการหมักคอมบูชา

ที่มา: Tran T. et al, 2020, หน้า 4

2.1.3 องค์ประกอบทางเคมี

ความเข้มข้นและชนิดของสารประกอบทางเคมีในน้ำหมักคอมบูชาแต่ละตัวอย่างอาจมีความแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น แหล่งที่มาของหัวเชื้อ ปริมาณของน้ำตาลและใบชาที่ใช้ ระยะเวลาในการหมัก และอุณหภูมิที่ใช้หมัก เป็นต้น หากมีความเปลี่ยนแปลงของปัจจัยเหล่านี้แม้เพียงปัจจัยเดียว ย่อมทำให้น้ำหมักคอมบูชาที่ได้มีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม องค์ประกอบหลักและสารเมตาบอไลท์ที่สำคัญที่พบในเครื่องดื่มคอมบูชาทั่วไปได้นำเสนอไว้ในตารางที่ 2.1[12] นอกจากนี้ ยังมีสารประกอบทางเคมีอื่นๆที่พบได้ในคอมบูชา ได้แก่ กรดออกซาลิก กรดฟอร์มิก กรดทาร์ทาริก กรดมาลิก กรดมาโลนิก กรดซัคซินิก กรดไพรูวิก กรดอะมิโน 14 ชนิด น้ำตาลซูโคส กลูโคส และฟรุคโตส ก๊าซคาร์บอนไดออไซด์ ฟีนอล และ D-saccharic acid-1,4-lactone (DSL)[8]

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบทางเคมีทั่วไปในน้ำหมักคอมบูชา

	สารประกอบ	ปริมาณสารประกอบโดยเฉลี่ย	ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น	ระยะเวลาในการหมัก	อ้างอิง
กรดอินทรีย์	กรดอะซิติก	5.6 g/L	70 g/L	15 วัน	Blanc (1996)
	กรดอะซิติก	8.36 g/L	100 g/L	18 วัน	Jayabalan et al. (2007)
	กรดอะซิติก	11 g/L	100 g/L	30 วัน	Chen and Liu (2000)
	กรดกลูโคนิก	39 g/L	100 g/L	60 วัน	Chen and Liu (2000)
	กรดกลูคูโลนิก	0.016 g/L	70 g/L	21 วัน	Loncar et al. (2006)
	กรดแลคติก	0.18 g/L	100 g/L	18 วัน	Jayabalan et al. (2007)
วิตามิน	วิตามิน บี1	0.74 mg/mL	70 g/L	15 วัน	Bauer-Petrovska and Petrushevska-Tozi (2000) Malbaˇsa et al. (2011)
	วิตามิน บี2	8 mg/100 mL	70 g/L	10 วัน	
	วิตามิน บี6	0.52 mg/mL	70 g/L	15 วัน	
	วิตามิน บี12	0.84 mg/mL	70 g/L	15 วัน	
	วิตามิน ซี	25 mg/L	70 g/L	10 วัน	
สารประกอบทั่วไป	เอทานอล	5.5 g/L	100 g/L	20 วัน	Chen and Liu (2000)
	โปรตีน	3 mg/mL	100 g/L	12 วัน	Jayabalan et al. (2007)
	โพลีฟีนอลจากใบชา	7.8 Mm GAE	100 g/L	15 วัน	Chu and Chen (2006)
แร่ธาตุ	ทองแดง เหล็ก แมงกานีส นิเกิ้ล สังกะสี	0.1 to 0.4 μg/mL	70 g/L	15 วัน	Bauer-Petrovska and Petrushevska-Tozi (2000)

ที่มา: ปรับปรุงจาก Villarreal-Soto SA, 2018, หน้า 581

ปริมาณน้ำตาลคงเหลือหลังการหมักจะมีความแตกต่างกันไปในแต่ละตัวอย่างซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ว่าวิถีการเผาผลาญและการใช้พลังงานไม่ได้เกิดขึ้นในรูปแบบเดิมเสมอไป จากการสังเกตการทดลองของ Jayaban et al (2007) พบว่าปริมาณกรดอะซิติกจะเพิ่มขึ้นสูงสุดที่ 9.5 กรัม/ลิตร ในวันที่ 15 ของการหมัก และปริมาณของกรดกลูคูโลนิกเพิ่มขึ้นสูงสุดอยู่ที่ 2.3 กรัม/ลิตร ในวันที่ 12 ของการหมัก[12] ปริมาณของแอลกอฮอล์ที่ได้จากการหมักขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นและเวลาที่ใช้หมัก โดยจากการศึกษาของ Chen and Liu (2000) พบว่าปริมาณของแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้นสูงสุดอยู่ที่ 5.5 กรัม/ลิตร ในวันที่ 20 ของการหมัก จากนั้นจะค่อยๆมีปริมาณลดลง ในขณะที่ Neffe-Skocin´ska et al. (2017) พบว่าปริมาณของแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้นสูงที่สุดอยู่ที่ 1.1% ในวันที่ 10 ของการหมัก โดยการเพิ่มปริมาณน้ำตาลในช่วงเริ่มต้นของการหมักส่งผลให้มีระดับแอลกอฮอล์ที่สูงขึ้นในน้ำหมัก[13]

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาที่พบว่าหลังจากการหมัก ในน้ำหมักคอมบูชามีปริมาณแร่ธาตุที่จำเป็นต่อสุขภาพเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$, $r = 0.991$) ได้แก่ ธาตุเหล็ก สังกะสี แมงกานีส นิเกิล ในขณะที่แร่ธาตุที่เป็นโลหะหนัก เช่น ตะกั่ว และแคดเมียม มีปริมาณที่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำชาหวานที่เตรียมไว้ก่อนเริ่มหมัก นอกจากนี้ จากการศึกษาของ Mamisahebei et al (2007) แสดงให้เห็นว่าคอมบูชามีประสิทธิภาพในการกำจัดสารโลหะหนัก เช่น สารหนู โครเมียม และทองแดงในเครื่องดื่ม และในน้ำเสียด้วย[13]

จากการศึกษาของ Essawet et al (2015) พบว่าสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญในคอมบูชา คือ สารโพลีฟีนอล และสารเมตาบอไลท์ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ในน้ำหมักคอมบูชา เช่น วิตามิน และกรดอินทรีย์ต่างๆ[13] และกระบวนการหมักทำให้สารประกอบฟีนอลต่างๆมีความเข้มข้นสูงขึ้น เพิ่มการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เพิ่มการดูดซึมและสามารถนำไปใช้ได้มากขึ้น ด้วยเหตุนี้จึงทำให้น้ำหมักคอมบูชามีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่าน้ำชาทั่วไปที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการหมัก[14]

2.1.4 องค์ประกอบทางชีวภาพ

จากกระบวนการหมักข้างต้นได้กล่าวถึงวัตถุดิบสำคัญที่ใช้ในการหมักซึ่งก็คือ น้ำหัวเชื้อคอมบูชา และส่วนที่เป็นวุ้นเซลลูโลส หรือที่รู้จักและเรียกกันโดยทั่วไปว่า SCOBY โดยชนิดของจุลินทรีย์ที่พบในคอมบูชามีความหลากหลายและแตกต่างกันไปในแต่ละตัวอย่างขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของหัวเชื้อ

2.1.4.1 ยีสต์ - จากการศึกษาพบยีสต์หลายสายพันธุ์ในคอมบูชา เช่น *Saccharomyces, Saccharomydoces, Schizosaccharomyces, Zygosaccharomyces, Brettanomyces/Dekkera, Candida, Torulospora, Koleckera, Pichia, Mycotorula* และ *Mycoderma*[8]

จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่ายีสต์บางสายพันธุ์ที่พบในคอมบูชามีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกส์ เช่น *Saccharomyces Boulardii* ซึ่งมีคุณสมบัติในการรักษาโรคเกี่ยวกับระบบทางเดินอาหาร โดยสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิปกติของร่างกายมนุษย์ สามารถทนความร้อนได้สูง โดยมีอัตราการรอดถึง 65% เมื่ออยู่ในอุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง สามารถทนต่อเอนไซม์เปปซิน เกลือน้ำดี และน้ำย่อยในกระเพาะอาหารซึ่งเป็นกรดไฮโดรคลอลิกได้ *Saccharomyces Boulardii* มีฤทธิ์ในการต้านจุลชีพก่อโรค เช่น คลอสไทรเดียม ดิฟฟิซายล์ (Clostridium Difficile) ซึ่งก่อให้เกิดอาการท้องเสียและลำไส้ใหญ่อักเสบที่ร้ายแรงถึงขั้นชีวิต สามารถใช้รักษาโรคลำไส้อักเสบเรื้อรัง โรคเชื้อราแคนดิดา โรคท้องร่วง นอกจากนี้ยังช่วยส่งเสริมระบบภูมิต้านทาน สามารถยับยั้งสารสื่อการอักเสบต่างๆ เช่น IL-8, MAP kinases และ NF-kB จากการติดเชื้อ *S. typhimurium, E coli, C. difficle, C. albicans* ได้[15]

2.1.4.2 แบคทีเรีย - ชนิดของแบคทีเรียที่พบมากที่สุดในคอมบูชา ได้แก่ *Acetobacter* และ *Gluconobacter* ซึ่งแบคทีเรียสายพันธุ์ *Acetobacter xylinum* เป็นสายพันธุ์พื้นฐานซึ่งทำงานร่วมกับยีสต์สายพันธุ์ *Zygosaccharomyces sp.* ในการผลิตวุ้นเซลลูโลส จากการศึกษาวิจัยในคอมบูชาพบกลุ่มแบคทีเรียกรดอะซิติก ได้แก่ แบคทีเรียชนิด *Acetobacter* สายพันธุ์ *A. Aceti, A. pasteurianus, A. nitrogenifigens*, ชนิด *Gluconacetobacter* สายพันธุ์ *Gluconacetobacter sp A4, G. sacchari, G. oxydans*, ชนิด *Komagataeibacter* สายพันธุ์ *K. xylinus, K. kombuchae*, ชนิด *Propionibacterium* และ ชนิด *Enterococcus* กลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในคอมบูชา ได้แก่ ชนิด *Lactobacillus* สายพันธุ์ *L. kefiranofaciens, L. nagelli* และชนิด *Lactococcus*[8]

ความสัมพันธ์ระหว่างยีสต์และแบคทีเรียในคอมบูชามีความสลับซับซ้อน กล่าวคือ สารชีวภาพที่ผลิตโดยจุลินทรีย์เหล่านี้อาจมีผลกระตุ้น หรือยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆที่อาศัยอยู่ร่วมกัน ซึ่งปฏิสัมพันธ์ระหว่างจุลชีพที่อาศัยอยู่ร่วมกันเหล่านี้ยังต้องมีการศึกษาค้นคว้าเพิ่มเติมเพื่อให้เกิดความเข้าใจเพิ่มมากขึ้น[9]

แบคทีเรียในคอมบูชามีความสำคัญเนื่องจากสามารถผลิตสารเมตาบอไลท์ที่มีประโยชน์ต่อร่างกายหลายชนิด ดังตัวอย่างที่แสดงในตารางที่ 2.2

นอกจากนี้แบคทีเรียบางชนิดที่พบในคอมบูชายังมีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกส์อีกด้วย เนื่องจากมีคุณสมบัติในการเกาะยึดตัวที่ผนังลำไส้ สามารถต้านจุลชีพก่อโรค ทนต่อยาปฏิชีวนะ ทนต่อน้ำย่อย น้ำดี และสามารถมีชีวิตรอดในสภาวะความเป็นกรดในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ได้ เช่น แบคทีเรีย *Lactobacillus*[9] ซึ่งในอุตสาหกรรมอาหารและสารเสริมอาหารได้มีการสกัดแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆของ *Lactobacillus* จากแหล่งต่างๆใช้กันอย่างแพร่หลาย นอกจากนี้แล้วยังมีการศึกษาเพื่อหาโปรไบโอติกส์จากแหล่งใหม่ๆที่นอกเหนือจากนมวัวและผลิตภัณฑ์จากนมวัว

คอมบูชาถือว่าเป็นหนึ่งในแหล่งอาหารเหล่านั้นที่ได้ถูกนำมาใช้ได้สำเร็จ แบคทีเรียกรดแลคติกชนิด *Pediococcus* สายพันธุ์ *Pediococcus pentosaceus* และ*Pediococcus acidiliactici* ที่สกัดจากคอมบูชาได้ถูกรับรองให้นำมาใช้ในการผลิตอาหารฟังก์ชันในอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากมีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกส์ โดยสามารถผลิตสารแบคเทอริโอซิน (bacteriocin) ซึ่งทำให้มีความสามารถในการยับยั้งจุลชีพก่อโรค สามารถทนต่อสภาพความเป็นกรดในทางเดินอาหารที่ระดับ pH 3.5 ความเข้มข้นของเอนไซม์เปปซิน 0.3% และเกลือน้ำดี 0.5% และในด้านการทนต่อเทคโนโลยีการผลิตอาหาร แบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์นี้มีคุณสมบัติที่ทนต่อเกลือแกง (NaCl) 5% และกระบวนการทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze Dry) โดยมีอัตรารอดอยู่ที่ 86-92% อย่างไรก็ตามแบคทีเรียชนิด *Pediococcus* นี้สามารถพบได้ในคอมบูชาเพียงบางตัวอย่างเท่านั้น[10]

ตารางที่ 2.2 ประโยชน์และคุณสมบัติของแบคทีเรียที่พบในคอมบูชา

แบคทีเรีย (ระดับ Genus/Species/Strains)	**ประโยชน์และคุณสมบัติ**	**อ้างอิง**
Gluconacetobacter	ผลิตกรดกลูคูโลนิก – ช่วยล้างพิษตับ	Vargas et al, 2021
Gluconacetobacter sp. A4	ผลิตสาร DSL (D-saccharic acid-1,4-lactone) – มีฤทธิ์ในการปกป้องตับ (ต้านมะเร็ง, ต้านอนุมูลอิสระ) ลดคอเลสเตอรอล	Vargas et al, 2021
Gluconobacter	ผลิตกรดกลูโคนิก – ต้านอนุมูลอิสระ	Mamlouk et al, 2013
Acetobacter aceti	ผลิตกรดอะซิตริก	Hiroseet al, 2020

ตารางที่ 2.2 (ต่อ)

แบคทีเรีย (ระดับ Genus/Species/Strains)	**ประโยชน์และคุณสมบัติ**	**อ้างอิง**
Lactobacillus plantarum SLG10	ผลิตแบคเทอริโอซิน (bacteriocin) – มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค และแบคทีเรียที่ดื้อยา	Pei et al, 2019
Pediococcus pentosaceus sp.	ผลิตแบคเทอริโอซิน (bacteriocin) – มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค และแบคทีเรียที่ดื้อยา	Vargas et al, 2021
Komagataeibacter	ผลิตวุ้นเซลลูโลส (SCOBY) และกรดอะซิติก	Mariǒ L, 2020

2.1.5 คุณสมบัติและประโยชน์ต่อสุขภาพ

จากองค์ประกอบทางเคมี และองค์ประกอบทางชีวภาพข้างต้น ทำให้คอมบูชามีคุณสมบัติในการช่วยส่งเสริมสุขภาพหลายประการ เช่น กรดอะซิติก เป็นสารที่พบว่ามีความเข้มข้นสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณสารชีวภาพอื่นๆในคอมบูชา มีการศึกษาว่าการบริโภคกรดอะซิติกในปริมาณที่เพียงพอจะช่วยให้เซลล์ตับและเซลล์กล้ามเนื้อเพิ่มการดูดซึมและนำน้ำตาลกลูโคสไปใช้ ส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลในเลือดลดลง และยังช่วยยับยั้งวิถีการสร้างไขมันและคลอเลสเตอรอลในตับ ซึ่งส่งผลให้ค่าคอเลสเตอรอลรวม LDL และ ไตรกลีเซอไรด์ในเลือดลดลง[13] กรดกลูโคนิกถือได้ว่าเป็นสารประกอบที่สำคัญที่ทำให้เครื่องดื่มคอมบูชามีคุณสมบัติโดดเด่นในการช่วยล้างพิษที่ตับในกระบวนการกลูคูโรนิเดชัน (Glucuronidation) โดยการทำให้สารพิษละลายน้ำและสามารถถูกขับออกจากร่างกายได้ ซึ่งการกำจัดของเสียที่คั่งค้างในระบบนี้ช่วยบรรเทาอาการที่เกิดจากสารสะสมสารพิษในร่างกาย เช่น อาการข้ออักเสบ รูมาตอยด์ และการเกิดหินปูนที่ไต[14] นอกจากนี้ สาร DSL ที่ผลิตโดยแบคทีเรีย *Gluconacetobacter sp.* โดยเฉพาะสายพันธุ์ *Gluconacetobacter sp. A4* ช่วยในการปกป้องตับ และช่วยลดคอเลสเตอรอลในเลือด โดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เบต้า-กลูคูโรนิเดส (β-glucuronidase) ซึ่งถูกสร้างขึ้นในไลโซโซมมาย่อยสลายการจับตัวของสารพิษและกรดกลูคูโรนิกในกระบวนการกลูคูโรนิเดชันที่ได้กล่าวถึงข้างต้น หรือเป็นเอนไซม์ที่ขัดขวางการกำจัดสารพิษออกจากร่างกายในกระบวนการนี้นั่นเอง สาร DSL นี้ยังช่วยป้องกันภาวะน้ำตาลสูงในเลือดที่เกิดจากการทำงานผิดปกติของตับเนื่องจากเซลล์ตับถูกทำลาย

ด้วย นอกจากนี้คอมบูชายังเป็นแหล่งของสารโพลีฟีนอลหลายชนิด เช่น *Thearubigins, Theaflavins, Flavonols* และ *Catechins* สารโพลีฟีนอลมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ช่วยป้องกันการเกิดโรคไม่ติดต่อเรื้อรังต่างๆ ซึ่งนอกจากการจะช่วยปกป้องเซลล์ปกติแล้ว ยังมีฤทธิ์ในการช่วยทำลายเซลล์มะเร็งด้วย[9]

มีรายงานและงานการศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติและประโยชน์ของคอมบูชาต่อสุขภาพหลายประการ อย่างไรก็ตามงานวิจัยส่วนใหญ่ยังเป็นการศึกษาในหลอดทดลอง ในสัตว์ทดลอง และเป็นการทำแบบสำรวจในกลุ่มคนที่ดื่มคอมบูชาเท่านั้น ยังไม่มีการทำการทดลองในมนุษย์ที่แสดงถึงประโยชน์ต่อสุขภาพของเครื่องดื่มคอมบูชาอย่างเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่ชัดเจน

2.1.5.1 งานวิจัยในหลอดทดลอง - คอมบูชามีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ต้านจุลชีพก่อโรค และต้านการอักเสบ ดังผลการทดลองที่แสดงใน ตารางที่ 2.3

2.1.5.2 งานวิจัยในสัตว์ทดลอง - คอมบูชาช่วยป้องกันโรคเบาหวานโดยช่วยลดน้ำตาลในเลือด และช่วยปกป้องตับ ตับอ่อน ไต และหัวใจของหนูที่เป็นเบาหวาน ช่วยลดคอเลสเตอรอลรวม และ LDL ช่วยให้มีอายุยืนโดยมีสุขภาพโดยรวมที่ดีขึ้น ช่วยลดความรุนแรงจากการถูกทำลายออกซิเดชันในสนามแม่เหล็กไฟฟ้าที่ 950 Mhz[8] อีกทั้งยังช่วยลดความเป็นพิษให้กับตับและไตของหนูที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอล และกรด thiobarbituric (TBARS) ในปริมาณสูง ซึ่งสารนี้เป็นสารที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของลิพิดซึ่งจัดเป็นอันตรายทางเคมี (chemical hazard) ในอาหาร[12]

2.1.5.3 งานวิจัยเชิงสำรวจ - มีรายงานถึงผลของการดื่มคอมบูชาว่ามีประโยชน์ต่อสุขภาพทั้งจากผู้ที่ดื่มคอมบูชา และนักวิจัยในประเทศรัสเซียว่า คอมบูชาช่วยล้างพิษในเลือด ช่วยลดคอเลสเตอรอล ลดการเกิดโรคหลอดเลือดตีบแข็ง ลดความดันโลหิต ลดการอักเสบ บรรเทาอาการข้ออักเสบ รูมาตอยด์ และอาการโรคเก๊าท์ ช่วยส่งเสริมการทำงานของตับ ช่วยทำให้การขับถ่ายเป็นปกติ รักษาสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ รักษาริดสีดวงทวาร ลดความอ้วน ช่วยควบคุมความหิว ช่วยป้องกันและรักษาโรคกระเพาะปัสสาวะอักเสบ ลดการเกิดหินปูนที่ไต กระตุ้นการทำงานของระบบต่อมไร้ท่อ ป้องกันโรคเบาหวาน ต้านมะเร็ง มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อก่อโรคต่างๆ เสริมภูมิต้านทาน บรรเทาอาการหลอดลมอักเสบและหอบหืด บรรเทาอาการประจำเดือนมาไม่ปกติ ส่งเสริมสุขภาพผม ผิว เล็บ ช่วยลดอาการอยากดื่มเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ช่วยลดความเครียดและอารมณ์แปรปรวนที่เกิดจากระบบประสาททำงานผิดปกติ บรรเทาอาการนอนไม่หลับ บรรเทาอาการปวดศีรษะ ทำให้สายตาดีขึ้น ช่วยชะลอวัย และทำให้ระบบการเผาผลาญทำงานได้ดีขึ้น[8]

ตารางที่ 2.3 คุณสมบัติทางชีวภาพของคอมบูชา – งานวิจัยในหลอดทดลอง

การทดสอบทางชีวภาพ	คอมบูชาที่ใช้ทดสอบ	ผลการทดสอบ	อ้างอิง
ฤทธิ์ในการต้านจุลชีพก่อโรค	หมัก 14 วัน	ยับยั้งการเจริญเติบโต ของเชื้อ *Shigellasonnei, Escherichia coli, Salmonella enteritidis and Salmonella typhimurium*	(Sreeramulu, Zhu, & Knol, 2000)
	หมัก 9 วัน	*Helicobacter pylori, Escherichia coli, Staphylococcus aureus and Agrobacterium tumefaciens*	(Greenwalt and others 1998)
	หมัก 21 วัน	*Candida glabrata, Candida tropicalis, Candida sake, Candida dubliniensis and Candida albicans*	(Battikh et al., 2012)
ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (DPPH)	หมัก 10 วัน โดยหมักกับแบคทีเรียกรดอะซิติก และยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae*	ยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 60% จากการทดสอบโดยวิธี DPPH	(Malbaˇsa et al., 2011)
	หมัก 7 วัน โดยใช้ใบชา Rooibos	ค่า EC_{50} = 20 mg/kg	(Hoon and others 2014)
	หมัก 21 วัน	ค่า IC_{50} = 0.92 mg/mL	(Chakravorty et al., 2016)

ตารางที่ 2.3 (ต่อ)

การทดสอบทางชีวภาพ	คอมบูชาที่ใช้ทดสอบ	ผลการทดสอบ	อ้างอิง
ฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ	หมัก 8 วัน โดยใช้การแช่ไม้โอ๊ค	ยับยั้งสารสื่อการอักเสบ เช่น TNF-alpha และ IL-6	(Vazquez-Cabral et al., 2017)
ฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง	หมัก 14 วัน โดยใช้สารคลอโรฟอร์ม เอทิลอะซิเตท และบิวทานอล	มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง 786-O อยู่ที่ 21.5% ยับยั้งการเติบโตของเซลล์มะเร็ง U2OS ได้ 93.45% และสามารถช่วยลดการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งได้	(Jayabalan et al., 2011)

ปรับปรุงจาก Villarreal-Soto SA, 2018, หน้า 586

2.1.6 รายงานเกี่ยวกับความเป็นพิษ

เนื่องจากคอมบูชาเป็นเครื่องดื่มที่นิยมหมักเพื่อบริโภคภายในครัวเรือน จึงมีข้อควรระวังเรื่องการปนเปื้อนของจุลชีพก่อโรคในขั้นตอนต่างๆของการหมัก มีรายงานความผิดปกติต่อสุขภาพหลังจากการดื่มน้ำหมักคอมบูชา เช่น อาการเวียนศีรษะ คลื่นไส้ อาการแพ้ ซึ่งทำให้มีข้อห้ามใช้ในหญิงที่ตั้งครรภ์และให้นมบุตร นอกจากนี้ มีรายงานความเป็นพิษในผู้ป่วยโรคเอดส์อายุ 22 ปี หลังจากรับประทานคอมบูชา 15 ชั่วโมง มีกรดแลคติกในเลือดสูง 12.9 mmol/L และค่า creatine สูง 2.1 mg/dL อย่างไรก็ตาม รายงานความเป็นพิษจากกรณีต่างๆที่พบนี้มีจำนวนที่น้อยมาก และยังไม่มีหลักฐานยืนยันอย่างแน่ชัดว่าเกิดจากการบริโภคคอมบูชา หรือเกิดจากความเจ็บป่วยที่บุคคลนั้นเป็นอยู่ก่อนแล้ว องค์การอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกาได้ทำการทดสอบและรายงานผลว่าน้ำหมักคอมบูชามีความปลอดภัยสำหรับการบริโภค มีการทำการทดลองในหนู โดยให้ดื่มคอมบูชาเป็นเวลา 90 วัน และบันทึกน้ำหนักตัว ปริมาณคอมบูชา และน้ำที่ให้ พฤติกรรมโดยทั่วไป และการตรวจชิ้นเนื้อ ผลการศึกษาคือ ค่าเลือดต่างๆเป็นปกติ การบริโภคคอมบูชาต่อเนื่องเป็นเวลา 90 วัน ไม่มีอาการเป็นพิษในหนูทดลอง[8] แต่เนื่องจากรายงานผลกระทบต่อสุขภาพที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น จึงควรผลิตภายใต้สภาพแวดล้อมที่สะอาดปราศจากเชื้อก่อโรคเพื่อหลีกเลี่ยงผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นได้[12]

2.2 ปัจจัยที่ส่งผลต่อความหลากหลายของสายพันธุ์แบคทีเรียในคอมบูชา

จากการศึกษาวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าคอมบูชามีความหลากหลายทางชีวภาพ กล่าวคือมีชนิดและสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่แตกต่างกันไปในแต่ละตัวอย่าง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น 1. *แหล่งที่มาของหัวเชื้อ* เนื่องจากสภาพภูมิประเทศ และภูมิอากาศที่แตกต่างกัน ทำให้มีแบคทีเรียประจำท้องที่ที่แตกต่างกันด้วย 2. *ระยะเวลาในการหมัก* จากการศึกษาของ Marsh AJ et al. (2014) พบความหลากหลายของชนิดแบคทีเรียในวันที่ 3 มากกกว่าวันที่ 10 ของการหมัก 3. *ค่า pH* ที่ลดลงระหว่างการหมัก ทำให้แบคทีเรียบางชนิดที่ไม่ทนกรดไม่สามารถมีชีวิตรอดได้[16] 4. *อุณหภูมิในการหมัก* จากการศึกษาพบว่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบความหลากหลายของชนิดแบคทีเรียมากว่าการหมักที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส โดยพบว่า*แบคทีเรีย Propionibacterium, Corynebacterium, Lactobacillus, Lactococcus* และ *Streptococcus* เจริญเติบโตได้ดีกว่าเชื้อแบคทีเรียบางชนิด[17] 5. *การใช้หัวเชื้อเดิมในการหมักต่อเนื่อง*หลายๆครั้งส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงวิวัฒนาการ และความหลากหลายของสายพันธุ์แบคทีเรีย 6. *วัตถุดิบที่ใช้ในการหมัก* เช่น ชนิดของใบชามีผลต่อการเจริญเติบโต และการอยู่รอดของแบคทีเรียที่แตกต่างกัน[11]

2.3 วิธีวิเคราะห์

จากการทบทวนงานวิจัยและเอกสารที่เกี่ยวข้อง พบว่าวิธีวิเคราะห์มาตรฐานเพื่อระบุชนิดและสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่นิยมใช้ในการศึกษา คือ การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rDNA หรืออาจเรียกสลับกันกับ 16S rRNA ได้ ซึ่งความละเอียดและความแม่นยำในการวิเคราะห์จะขึ้นอยู่กับจำนวนคู่เบสของ DNA ที่ใช้วิเคราะห์ โดยวิธี 16S rDNA metabarcoding ใช้คู่เบสจำนวนประมาณ 300-500 คู่ สามารถวิเคราะห์ได้ในระดับ phylum และได้ระดับละเอียดที่สุดคือระดับ genus เท่านั้น ยังไม่สามารถระบุได้ถึงในระดับ species ส่วนการวิเคราะห์ในระดับที่ละเอียดขึ้นที่สามารถระบุได้ในระดับ species จะใช้วิธี 16S rDNA Sequencing of Culturable Bacteria ซึ่งเป็นวิธีวิเคราะห์ที่คล้ายกันแต่ใช้จำนวนคู่เบสที่ยาวกว่า คือ จำนวนประมาณ 1,400-1,500 คู่

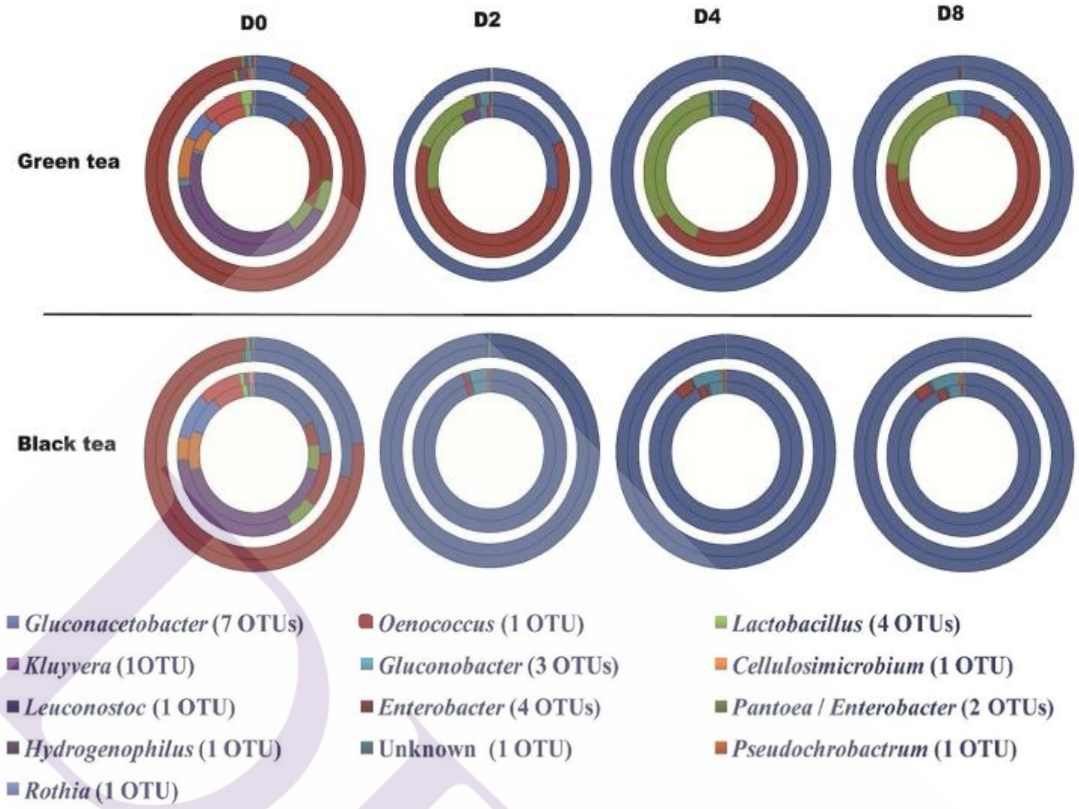
2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับองค์ประกอบของคอมบูชา พบความหลากหลายของชนิดแบคทีเรียในตัวอย่างคอมบูชาที่แตกต่างกัน

Coton et al. (2007) ได้ทำการทดลองหมักคอมบูชาโดยใช้ตัวแปรที่แตกต่างกัน คือชนิดของใบชา ได้แก่ ชาดำ และชาเขียว ภายใต้ปัจจัยการหมักอื่นๆที่เหมือนกัน เช่น แหล่งที่มาของหัว

เชื้อตั้งต้น ปริมาณของวัตถุดิบ อุณหภูมิ และระยะเวลาในการหมัก และได้นำตัวอย่างน้ำชาหมักมาทดสอบเพื่อระบุหาชนิดและปริมาณของแบคทีเรียในวันที่เริ่มกระบวนการหมัก (D0), วันที่ 2 (D2), วันที่ 4 (D4), และวันที่ 8 (D8) จากภาพที่ 2.2 พบว่าเมื่อเวลาผ่านไปจากวันที่เริ่มกระบวนการหมัก ปริมาณของแบคทีเรียแต่ละชนิดมีการเปลี่ยนแปลงไปในลักษณะที่แตกต่างกันระหว่างชาทั้งสองชนิด กล่าวคือ การใช้ชาเขียวในการหมักส่งผลให้มีการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Oenococcus Oeni* และแบคทีเรีย *Lactobacillus* ในน้ำชาหมักมากกว่าการหมักด้วยชาดำ ในขณะที่ตัวอย่างที่หมักด้วยชาดำมีการเจริญเติบโตของแบคทีเรียชนิด *Gluconacetobacter* เป็นหลัก นอกจากนี้ยังพบว่ามีความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำชาหมักที่หมักด้วยชาเขียวมากกว่าตัวอย่างที่หมักด้วยชาดำ ส่วนในวุ้นเซลลูโลส แบคทีเรียชนิดหลักที่พบเหมือนกันตั้งแต่การหมักในวันที่ 2 ของทั้งสองตัวอย่างคือแบคทีเรีย *Gluconacetobacter*

นอกจากนี้ Marsh et al. (2014) ได้ทำการศึกษาชนิดของแบคทีเรียในตัวอย่างคอมบูชาที่หมักด้วยหัวเชื้อที่มาจากแหล่งที่มีภูมิประเทศแตกต่างกันจำนวน 5 แหล่ง โดยหัวเชื้อ 2 ตัวอย่างมาจากประเทศแคนาดา (Ca1 และ Ca2) และอีก 3 ตัวอย่าง มาจากประเทศไอร์แลนด์ (Ire) สหราชอาณาจักร (UK) และสหรัฐอเมริกา (USA) โดยใช้หัวเชื้อทั้งส่วนที่เป็นวุ้นเซลลูโลส และส่วนที่เป็นน้ำชาหมัก นำหัวเชื้อ 5 ตัวอย่างข้างต้นนี้มาหมักภายใต้เงื่อนไขอื่นๆที่เหมือนกัน เช่น ปริมาณและชนิดของน้ำตาลและใบชา อุณหภูมิที่ใช้หมัก ระยะเวลา และขั้นตอนในการหมัก จากนั้นจึงนำตัวอย่างของน้ำหมักทั้ง 5 ตัวอย่างนี้มาทดสอบเพื่อหาชนิดและปริมาณของแบคทีเรียในวันที่ 3 และวันที่ 10 ของการหมัก โดยวิธีที่ใช้วิเคราะห์ตัวอย่างคือ วิธี 16S rRNA Sequencing จากผลการทดลองในตารางที่ 2.4 พบว่ามีปริมาณแบคทีเรียชนิด *Gluconacetobacter* ในน้ำหมักมากกว่า 85% ในทุกตัวอย่าง ทั้งการทดสอบตัวอย่างในวันที่ 3 และในวันที่ 10 นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรีย *Lactobacillus* มากเป็นลำดับรองลงมา ซึ่งมีปริมาณเพิ่มขึ้นจากวันที่ 3 ถึง วันที่ 10 จาก 5 ตัวอย่างนี้ คอมบูชาที่หมักโดยหัวเชื้อจากประเทศไอร์แลนด์มีปริมาณของ แบคทีเรีย *Lactobacillus* สูงที่สุด โดยเพิ่มจาก 3.57% เป็น 9.59% ในวันที่ 3 และวันที่ 10 ตามลำดับ และยังพบว่าแบคทีเรียชนิดอื่นๆ เช่น *Lactococcus, Leuconostoc* และ *Bifidobacterium* มีลดปริมาณลงจากวันที่ 3 จนถึงไม่พบเลย ในวันที่ 10 แสดงถึงการไม่เจริญเติบโต และอัตราการรอดชีวิตที่ต่ำในระหว่างกระบวนการหมัก



ภาพที่ 2.2 ชนิดของแบคทีเรียและระดับความชุกชุมสัมพัทธ์ (relative abundance) ในตัวอย่างคอมบูชาที่ใช้ชาเขียวและชาดำในการหมัก วิเคราะห์โดยวิธี 16S rDNA metabarcoding วงกลมวงใน 2 วง แสดงระดับความชุกสัมพัทธ์ของแบคทีเรียในน้ำชาหมัก วงกลมวงนอก 2 วง แสดงระดับความชุกสัมพัทธ์ของแบคทีเรียในวุ้นเซลลูโลส โดยวงกลม 2 วงที่ซ้อนกัน หมายถึง การทดสอบตัวอย่างเดียวกันซ้ำกัน 2 ครั้ง

ที่มา: Tran et al, 2020, หน้า 12

ตารางที่ 2.4 ชนิดของแบคทีเรียและระดับความชุกชุมสัมพัทธ์ (relative abundance) ในตัวอย่างคอมบูชาที่หมักจากตัวอย่างหัวเชื้อจาก 5 แหล่ง วิเคราะห์โดยวิธี 16S rRNA Sequencing

	Ca1	**Ca2**	**Ire**	**UK**	**US**
Day 3					
Acetobacter	0.86	0	0.43	0	0
Gluconacetobacter	86.91	97.79	93.09	98.14	95.73
Lactobacillus	3.93	1.13	3.57	1.19	1.77
Lactococcus	1.56	0.51	1.77	0.37	0
Leuconostoc	0.52	0	0	0	0
Bifidobacterium	0.3	0	0	0	0
Thermus	0.22	0	0.2	0	0
Allobaculum	0	0	0	0	0.88
Ruminococcaceae Incertae Sedis	0	0	0	0	0.19
Propionibacterium	0	0	0.2	0	0
Other	5.75	0.58	0.75	0.3	1.42
Day 10					
Acetobacter	0	0	0.19	0	0
Gluconacetobacter	92.17	93.16	94.26	94.26	95.73
Lactobacillus	5.96	6.17	1.44	1.44	3.47
Lactococcus	0	0.23	0	0	0.18
Leuconostoc	0	0	0	0	0
Bifidobacterium	0	0	0	0	0
Thermus	0.66	0	3.73	3.73	0
Allobaculum	0	0	0	0	0
Ruminococcaceae Incertae Sedis	0	0	0	0	0
Other	1.22	0.45	0.58	0.58	0.61

ที่มา: ปรับปรุงจาก Marsh AJ, 2014, หน้า 17

บทที่ 3
ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 รูปแบบงานวิจัย

การศึกษาค้นคว้าอิสระนี้เป็นงานวิจัยเชิงสำรวจเพื่อศึกษาชนิดและสายพันธุ์ของแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์คอมบูชาพร้อมดื่มที่วางจำหน่ายในประเทศไทย กลุ่มแบคทีเรียที่สนใจศึกษา คือ กลุ่มแบคทีเรียกรดอะซิติก (Acetic acid bacteria) และกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria) โดยงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาขั้นต้น (Preliminary study)

3.2 ประชากรและตัวอย่าง

3.2.1 ประชากร ผลิตภัณฑ์คอมบูชาพร้อมดื่มที่วางจำหน่ายในประเทศไทย

3.2.2 ตัวอย่าง ผลิตภัณฑ์คอมบูชาพร้อมดื่มที่วางจำหน่ายตามร้านจำหน่ายสินค้าเพื่อสุขภาพและร้านค้าออนไลน์ต่างๆในประเทศไทย จำนวน 6 ตัวอย่าง เครื่องหมายการค้าละ 1 ตัวอย่าง

3.3 เกณฑ์การคัดเลือก

ใช้วิธีการสุ่มกลุ่มตัวอย่างโดยไม่ใช้ความน่าจะเป็น (Nonprobability sampling) โดยการเลือกกลุ่มตัวอย่างแบบเจาะจง (Purposive sampling)

ปัจจุบันในประเทศไทยมีผลิตภัณฑ์คอมบูชาพร้อมดื่มวางจำหน่ายในท้องตลาดมากกว่า 80 ยี่ห้อ ทั้งในร้านค้าจำหน่ายสินค้าเพื่อสุขภาพและร้านค้าออนไลน์ โดยมียี่ห้อที่ได้รับการรับรองมาตรฐานการผลิตจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อ.ย.) จำนวน 3 ยี่ห้อ ผู้วิจัยเลือก 2 ตัวอย่างจากยี่ห้อที่มี อ.ย. เนื่องจาก 1 ใน 3 ยี่ห้อนี้ใช้การเติมเชื้อแบคทีเรียที่ไม่ได้เกิดจากการหมักด้วยวิธีการดั้งเดิมของการหมักคอมบูชา ผู้วิจัยจึงไม่ใช้ตัวอย่างดังกล่าวในการศึกษาครั้งนี้

เลือกตัวอย่างผลิตภัณฑ์คอมบูชาอีก 4 ตัวอย่างซึ่งไม่มีมาตรฐานการรับรองจาก อ.ย. โดยเลือกซื้อยี่ห้อยอดนิยมหรือที่สามารถพบเห็นได้บ่อยจากร้านค้าออนไลน์และร้านจำหน่ายสินค้าเพื่อสุขภาพชั้นนำในเขตกรุงเทพมหานคร และเลือกยี่ห้อที่มีจำหน่ายรสชาติดั้งเดิม เนื่องจากต้องการควบคุมตัวแปรกวนจากการเติมรสชาติหรือจากการหมักแบบ 2nd Fermentation (F2)

3.4 ขั้นตอนการศึกษาวิจัย

3.4.1 ทบทวนงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

3.4.2 เลือกตัวอย่างผลิตภัณฑ์คอมบูชา จำนวน 6 ตัวอย่าง ตามเกณฑ์การคัดเลือก

3.4.3 จัดซื้อ และรวบรวมตัวอย่าง

3.4.4 บันทึกข้อมูลทั่วไปของตัวอย่างผลิตภัณฑ์คอมบูชาลงในตาราง

3.4.5 ส่งตัวอย่างทั้งหมดเพื่อตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการพร้อมกันโดยใช้การแช่เย็นตลอดทุกขั้นตอน ทั้งการจัดเก็บและการขนส่ง

3.4.6 รวบรวมผลการทดสอบจากห้องปฏิบัติการโดยบันทึกข้อมูลในตาราง

3.4.7 นำผลการตรวจสอบทางห้องปฏิบัติการที่ได้มาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

3.4.8 อภิปรายผลการทดสอบ

3.5 วิธีการทดสอบวิจัย

การทดสอบวิจัยครั้งนี้ดำเนินการโดยส่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์คอมบูชาให้ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ โดยใช้วิธีวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณตำแหน่งยีน 16S rRNA ดังกล่าวไว้ในภาคผนวก ก ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานในการระบุชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย

3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล

รวบรวมผลการทดสอบ และบันทึกผลการวิเคราะห์ในตาราง จากนั้นจึงนำผลการทดสอบที่ได้มาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยใช้สถิติเชิงพรรณนา (descriptive statistics)

3.7 สถานที่ทำการวิเคราะห์

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ เลขที่ 113 อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย ถนนพหลโยธิน ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

บทที่ 4

ผลการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการศึกษาเชิงสำรวจโดยการเลือกกลุ่มตัวอย่างแบบเจาะจงของเครื่องดื่มคอมบูชาพร้อมดื่ม จำนวน 6 ตัวอย่าง ที่วางจำหน่ายตามร้านสินค้าเพื่อสุขภาพในเขตกรุงเทพมหานครและร้านค้าออนไลน์เพื่อวิเคราะห์หาชนิดและสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดอะซิติกและแบคทีเรียกรดแลคติก โดยผู้วิจัยได้ส่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์คอมบูชาให้ศูนย์พันธุวิศวกรรม และเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติเพื่อทำการทดสอบวิจัย โดยใช้วิธีการแช่เย็นตลอดทุกขั้นตอนตั้งแต่การขนส่งและการจัดเก็บตัวอย่าง

4.1 ข้อมูลทั่วไปของตัวอย่างเครื่องดื่มคอมบูชาที่ใช้ทำการวิเคราะห์

จากการเลือกกลุ่มตัวอย่างแบบเจาะจง จำนวน 6 ตัวอย่าง ผู้ศึกษากำหนดรหัสแทนชื่อการค้าของเครื่องดื่มคอมบูชาที่ใช้ในงานวิจัย ดังนี้ A, B, C, D, E และ F ดังตารางที่ 4.1 แสดงรสชาติ ชนิดของใบชาที่ใช้หมัก การรับรองจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ช่องทางการจัดซื้อ และวันหมดอายุ

ตารางที่ 4.1 ข้อมูลทั่วไปของตัวอย่างเครื่องดื่มคอมบูชาที่ใช้ศึกษาในงานวิจัยทั้งหมด 6 ตัวอย่าง

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	รสชาติ	ชนิดของใบชาที่ใช้หมัก	การรับรองจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา	ช่องทางการจัดซื้อ	วันหมดอายุ (dd-mm-yy)
1	A	ดั้งเดิม	ชาดำ	ไม่มี อ.ย.	ร้านค้าจำหน่ายสินค้าเพื่อสุขภาพ	30-06-65

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	รสชาติ	ชนิดของใบชาที่ใช้หมัก	การรับรองจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา	ช่องทางการจัดซื้อ	วันหมดอายุ (dd-mm-yy)
2	B	ดั้งเดิม	ชาเขียว	ไม่มี อ.ย.	ร้านค้าจำหน่ายสินค้าเพื่อสุขภาพ	10-08-65
3	C	ดั้งเดิม	ชาดำ+ชาเขียว	ไม่มี อ.ย.	ร้านค้าจำหน่ายสินค้าเพื่อสุขภาพ	11-07-65
4	D	ดั้งเดิม	ชาดำ+ชาเขียว	มี อ.ย.	ร้านค้าจำหน่ายสินค้าเพื่อสุขภาพ	03-10-66
5	E	มิกซ์เบอร์รี่	ชาดำ+ชาเขียว	มี อ.ย.	ร้านค้าออนไลน์	ไม่ระบุ
6	F	ดั้งเดิม	ชาดำ	ไม่มี อ.ย.	ร้านค้าจำหน่ายสินค้าเพื่อสุขภาพ	05-05-65

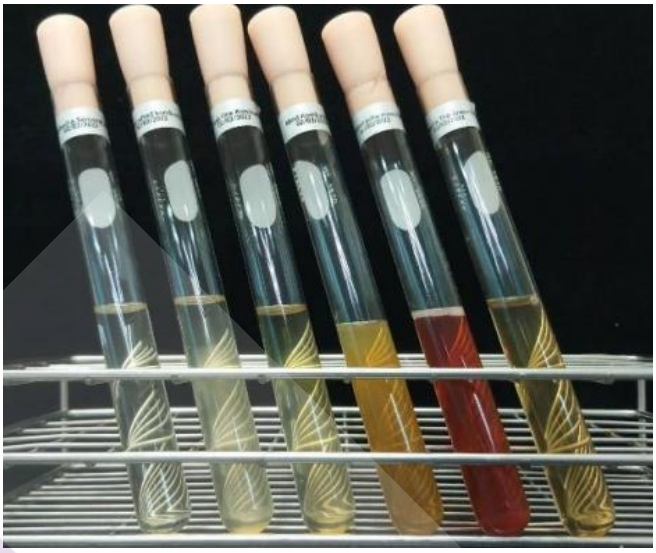
หมายเหตุ. วันที่ส่งวิเคราะห์ตัวอย่าง 2 กุมภาพันธ์ 2565

ตารางที่ 4.2 แสดงภาพลักษณะตัวอย่าง

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	ลักษณะตัวอย่าง	ภาพแสดงลักษณะตัวอย่าง
1	A	บรรจุในขวดแก้วใส ตัวอย่างมีสีอ่อน ลักษณะค่อนข้างใส มีตะกอนลักษณะเป็นแผ่นแขวนลอยในตัวอย่างเล็กน้อย	
2	B	บรรจุในขวดแก้วใส ตัวอย่างมีสีอ่อน ลักษณะขุ่นเล็กน้อย มีตะกอนลักษณะเป็นแผ่นแขวนลอยในตัวอย่างเล็กน้อย	

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	ลักษณะตัวอย่าง	ภาพแสดงลักษณะตัวอย่าง
3	C	บรรจุในขวดพลาสติกสีชา ตัวอย่างมีสีน้ำตาลอ่อนขุ่นเล็กน้อย	
4	D	บรรจุในขวดแก้วใส ตัวอย่างมีสีน้ำตาลค่อนข้างขุ่น	
5	E	บรรจุในขวดแก้วใส ตัวอย่างมีสีแดง ลักษณะค่อนข้างขุ่น	
6	F	บรรจุในขวดแก้วใส ตัวอย่างมีสีน้ำตาลขุ่นเล็กน้อย และมีตะกอนลักษณะเป็นแผ่นแขวนลอยในตัวอย่างเล็กน้อย	



ภาพที่ 4.1 แสดงสีและความขุ่นของตัวอย่างเครื่องดื่มคอมบูชา โดยเรียงลำดับจากซ้ายไปขวา ดังนี้ A, B, C, D, E และ F

4.2 ผลการวิเคราะห์ชนิดและสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดอะซิติก และแบคทีเรียกรดแลคติกในผลิตภัณฑ์คอมบูชาพร้อมดื่ม

จากการคัดแยกแบคทีเรียกรดอะซิติก และแบคทีเรียกรดแลคติกโดยวิธี enrichment culture สามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียได้จากตัวอย่าง 4 ตัวอย่าง ได้แก่ A, C, E และ F โดยพบเฉพาะแบคทีเรียชนิดผลิตกรดอะซิติก ไม่พบการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกในทุกตัวอย่าง ผลการวิเคราะห์ชนิดของแบคทีเรียที่พบแสดงในตารางที่ 4.3

จากการศึกษาจำนวนของเชื้อแบคทีเรีย พบการเจริญของแบคทีเรียผลิตกรดแอซิติกในตัวอย่างทั้ง 4 ตัวอย่างน้อยกว่า 10 โคโลนีต่อจานเพาะเชื้อ ทำให้ไม่สามารถรายงานจำนวนแบคทีเรียดังกล่าวได้ นอกจากนี้ พบการเจริญของยีสต์ ในตัวอย่างที่ศึกษา 5 ตัวอย่าง ได้แก่ A, B, C, E และ F โดยไม่พบการเจริญของจุลินทรีย์ (ทั้งแบคทีเรียและยีสต์)ในตัวอย่าง 1 ตัวอย่าง ได้แก่ D

ตารางที่ 4.3 ผลวิเคราะห์ การระบุชนิดและสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างคอมบูชาโดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณตำแหน่งยีน 16S rRNA

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	การรับรองจาก อ.ย.	ชนิด/สายพันธุ์แบคทีเรียที่พบ	
			กลุ่มแบคทีเรียกรดอะซิติก	กลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติก
1	A	ไม่มี อ.ย.	- *Komagataeibacter saccharivorans*, - *Komagataeibacter melaceti*	ไม่พบ
2	B	ไม่มี อ.ย.	ไม่พบ	ไม่พบ
3	C	ไม่มี อ.ย.	- *Komagataeibacter sp.* (close to *Komagataeibacter europaeus*)	ไม่พบ
4	D	มี อ.ย.	ไม่พบ	ไม่พบ
5	E	มี อ.ย.	- *Acetobacter musti*, - *Acetobacter sp.* (close to *Acetobacter peroxydans/papayae*)	ไม่พบ
6	F	ไม่มี อ.ย.	- *Komagataeibacter saccharivorans*, - *Gluconobacter sp.* (close to *Gluconobacter oxydans*), - *Acetobacter sp.* (close to *Acetobacter syzygii*)	ไม่พบ

บทที่ 5
อภิปรายผลการทดลอง สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

5.1 อภิปรายผลการทดลอง

จากผลการวิเคราะห์ชนิดและสายพันธุ์แบคทีเรียกรดอะซิติกและแบคทีเรียกรดแลคติกในผลิตภัณฑ์คอมบูชาพร้อมดื่ม จำนวน 6 ตัวอย่าง ในจำนวน 2 ตัวอย่างที่ได้รับการขึ้นทะเบียนจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อ.ย.) พบว่ามี 1 ตัวอย่างที่ไม่พบการเจริญของทั้งแบคทีเรียและยีสต์ เนื่องจากผู้ผลิตฆ่าเชื้อโดยวิธีพลาสเจอไรซ์ (pasteurization) เพื่อให้เป็นไปตามมาตรฐานการควบคุมปริมาณจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 356) พ.ศ. 2556 เรื่อง เครื่องดื่มในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท ข้อ 4 (4)-(8) อย่างไรก็ตาม พบว่าอีก 1 ตัวอย่าง ที่ได้รับการขึ้นทะเบียน อ.ย. มีการเจริญของยีสต์ และพบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติก 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Acetobacter musti* และ *Acetobacter sp.* (close to *Acetobacter peroxydans/papayae*) จากการสอบถามทางผู้ผลิต ทราบว่าตัวอย่างที่ผู้วิจัยได้รับยังเป็นล็อตจำหน่ายที่ไม่ได้ผ่านการพลาสเจอไรซ์ แต่ปัจจุบันทางผู้ผลิตได้ทำการพลาสเจอไรซ์เครื่องดื่มคอมบูชาให้เป็นไปตามมาตรฐานการผลิตตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขแล้ว

นอกจากนี้ พบว่ามี 1 ตัวอย่าง ที่มีการเจริญของยีสต์ แต่ไม่พบการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งไม่สอดคล้องกับผลงานวิจัยก่อนหน้านี้ซึ่งพบการเจริญของแบคทีเรียด้วยในทุกตัวอย่าง สาเหตุอาจเกิดจากปัจจัยในกระบวนการผลิตและปัจจัยในกระบวนการจัดเก็บผลิตภัณฑ์หลังบรรจุขวด เช่น คุณภาพและปริมาณของวัตถุดิบที่ใช้หมัก ระยะเวลาและอุณหภูมิในการหมัก รวมถึงระยะเวลาและอุณหภูมิในการจัดเก็บผลิตภัณฑ์ที่สามารถส่งผลต่อจำนวนประชากร และการอยู่รอดของเชื้อแบคทีเรียได้

จาก 4 ตัวอย่างที่พบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ พบว่ามีการเจริญของเชื้อแบคทีเรียกรดอะซิติกจำนวน 3 ชนิด คือ *Acetobacter, Gluconobacter* และ *Komagataeibacter* จำนวนทั้งสิ้น 7 สายพันธุ์ โดยสามารถระบุสายพันธุ์ที่ชัดเจนได้จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่

Komagataeibacter saccharivorans, Komagataeibacter melaceti และ *Acetobacter musti* แบคทีเรียผลิตกรดแอซิติกที่พบในตัวอย่างที่ศึกษานี้ทุกชนิด จัดอยู่ในสกุลเดียวกับแบคทีเรียที่พบในตัวอย่างคอมบูชาที่มีรายงานก่อนหน้านี้[11,12,18,19] ไม่พบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในทุกตัวอย่าง สอดคล้องกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้ซึ่งสามารถพบแบคทีเรียกรดแลคติกในคอมบูชาได้เพียงในบางตัวอย่างเท่านั้น[14] ปัจจัยที่ส่งผลถึงความหลากหลายและการอยู่รอดของจุลินทรีย์ในคอมบูชา ได้แก่ แหล่งที่มาและคุณภาพของหัวเชื้อ วัตถุดิบในการหมัก ระยะเวลาในการหมัก ค่า pH อุณหภูมิ การใช้หัวเชื้อเดิมในการหมักต่อเนื่องหลายๆครั้ง รวมถึงอุณหภูมิและระยะเวลาในการจัดเก็บผลิตภัณฑ์คอมบูชา

งานวิจัยนี้ศึกษาชนิดและสายพันธุ์แบคทีเรียด้วยวิธีวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณตำแหน่งยีน 16S rRNA โดยวิเคราะห์แบบ double strand ซึ่งเป็นวิธีวิเคราะห์ตามมาตรฐานสากลและมีความละเอียดแม่นยำมากกว่าการวิเคราะห์แบบ single strand ผู้ศึกษาเลือกใช้วิธีการแช่เย็นตลอดกระบวนการตั้งแต่การจัดเก็บตัวอย่างจนถึงขั้นตอนการส่งวิเคราะห์เนื่องจากผู้ขายส่วนใหญ่ใช้วิธีดังกล่าวในการวางจำหน่ายผลิตภัณฑ์ ณ จุดขายถึงมือผู้บริโภค

จาก Gap of knowledge ของงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้ทำการค้นคว้างานวิจัยก่อนหน้านี้ถึงคุณสมบัติของแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆที่พบในการศึกษานี้ จากงานวิจัยที่ผู้วิจัยสามารถค้นพบได้ในปัจจุบัน พบว่าแบคทีเรียทุกสายพันธุ์จากการศึกษานี้ไม่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกส์ จากการศึกษาของประเทศสิงคโปร์ ซึ่งทำการคัดแยกแบคทีเรียได้จำนวน 17 สายพันธุ์ จากคีเฟอร์น้ำและนมคีเฟอร์เพื่อทำการทดสอบคุณสมบัติของการเป็นโปรไบโอติกส์ โดยทดสอบการออกฤทธิ์ในการต้านจุลชีพก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร และความสามารถในการแข่งขันแย่งกันเกาะตัวที่ผนังเซลล์ลำไส้ระหว่างแบคทีเรียที่ศึกษากับจุลชีพก่อโรค พบว่าแบคทีเรียกลุ่ม *Acetobacter* และ *Gluconobacter* ไม่ผ่านคุณสมบัติที่ทำการทดสอบจึงทำให้ไม่ถูกจัดว่าเป็นแบคทีเรียในกลุ่มโปรไบโอติกส์[20] ในปัจจุบัน ยังไม่มีรายงานการศึกษาถึงคุณสมบัติของการเป็นโปรไบโอติกส์ของสายพันธุ์ *Komagataeibacter Saccharivorans* และ *Komagataeibacter melaceti* จากการศึกษาก่อนหน้านี้ซึ่งศึกษาถึงคุณสมบัติของแบคทีเรียชนิด *Komagataeibacter* พบว่ามีคุณสมบัติหลักและโดดเด่นในการผลิตวุ้นเซลลูโลส[21,22] *Komagataeibacter xylinus* เป็นหนึ่งในแบคทีเรียสายพันธุ์หลักที่พบได้บ่อยในตัวอย่างคอมบูชาทั่วไป[11] และมีการศึกษาสายพันธุ์ย่อยของสายพันธุ์ดังกล่าวในตัวอย่างน้ำส้มสายชูแอปเปิ้ล จากจำนวน 43 สายพันธุ์ย่อย พบว่า *Komagataeibacter xylinus K.X.1* มีคุณสมบัติที่สามารถใช้เป็นโปรไบโอติกส์ได้[23] อย่างไรก็ตาม ผลวิเคราะห์จากการศึกษาครั้งนี้ไม่พบ

สายพันธุ์ย่อยนี้ ทำให้สรุปได้ว่าอาจมีความเป็นไปได้ว่าจะสามารถพบสายพันธุ์ที่เป็นโปรไบโอติกส์ดังกล่าวได้ในบางตัวอย่างของคอมบูชาซึ่งต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

นอกจากนี้ จากการวิเคราะห์จำนวนของเชื้อแบคทีเรียที่มีชีวิตจากตัวอย่างคอมบูชาในการศึกษานี้ พบว่ามีปริมาณเชื้อแบคทีเรียน้อยกว่า 10 โคโลนีต่อจานเพาะเชื้อ หรือมีจำนวนต่ำกว่า 10^2 CFU/ml ซึ่งเป็นปริมาณที่น้อยเกินกว่าจะสามารถรายงานจำนวนแบคทีเรียดังกล่าวได้ ในขณะที่มาตรฐานสากลได้ระบุไว้ว่าปริมาณของโปรไบโอติกส์ที่เหมาะสมควรมีจำนวนประมาณ 10^6 - 10^8 CFU/ml เพื่อให้สามารถมีผลในการรักษาได้[23]

เนื่องจากการศึกษานี้มุ่งศึกษาเฉพาะชนิดและสายพันธุ์ของแบคทีเรียเท่านั้น การจะกล่าวอ้างว่าในตัวอย่างผลิตภัณฑ์คอมบูชามีโปรไบโอติกส์หรือไม่ จำเป็นต้องศึกษาชนิดและสายพันธุ์ของยีสต์เพิ่มเติม ด้วยเหตุว่ายีสต์บางสายพันธุ์มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกส์ เช่น *Saccharomyces cerevisiae*[13] และ *Saccharomyces boulardii*[14] ซึ่งสามารถพบได้ในตัวอย่างคอมบูชาจากการศึกษาก่อนหน้านี้ ดังนั้น จากผลการวิเคราะห์ชนิดและสายพันธุ์แบคทีเรียในผลิตภัณฑ์คอมบูชาในการศึกษาครั้งนี้ และจากคำนิยามขององค์การอนามัยโลก (WHO) ซึ่งกล่าวว่า “โปรไบโอติกส์ หมายถึง จุลินทรีย์มีชีวิตจำพวกแบคทีเรียและยีสต์ที่ดีและเป็นประโยชน์ต่อร่างกาย ซึ่งเมื่อบริโภคเข้าไปในปริมาณที่เหมาะสมจะส่งผลให้มีสุขภาพดี” ทำให้ผู้ผลิตจำเป็นต้องวิเคราะห์เพิ่มเติม และระบุบนฉลากถึงสายพันธุ์และจำนวนของแบคทีเรียและยีสต์ ก่อนการกล่าวอ้างสรรพคุณบนฉลากของผลิตภัณฑ์คอมบูชาที่วางจำหน่ายว่ามีโปรไบโอติกส์

การผลิตคอมบูชาเพื่อให้ได้มาตรฐานหรือมีความเหมือนกันในด้านขององค์ประกอบทางชีวภาพในทุกล็อตการผลิตเป็นสิ่งที่ทำได้ยาก เนื่องจากไม่สามารถควบคุมปัจจัยทั้งหมดได้ตั้งแต่กระบวนการการผลิต และการเก็บรักษา ตลอดจนเมื่อสินค้าส่งถึงมือผู้บริโภค การหมักในสภาพแวดล้อมแบบเปิด ปัจจัยด้านระยะเวลา อุณหภูมิในการขนส่ง และสภาพแวดล้อมในการเก็บรักษาที่แตกต่างกันก็สามารถส่งผลให้เกิดความเปลี่ยนแปลงของชนิดและความหลากหลายของจุลินทรีย์ได้ จากผลการศึกษาที่ทบทวนงานวิจัยอย่างเป็นระบบพบว่า ส่วนใหญ่มักไม่พบสายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกส์ในตัวอย่างคอมบูชา หรืออาจพบได้ในปริมาณที่น้อยมากโดยเฉพาะหลังจากการบรรจุและจัดเก็บผลิตภัณฑ์ และเนื่องจากค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ชนิดของจุลินทรีย์ซึ่งมีราคาสูงยังเป็นข้อจำกัดที่สำคัญในการระบุชนิดของจุลินทรีย์บนฉลาก ทำให้กฎหมายของหลายประเทศในทวีปยุโรปไม่อนุญาตให้ใช้คำกล่าวอ้างว่ามีโปรไบโอติกส์บนฉลากเครื่องดื่มคอมบูชา[14]

อย่างไรก็ตาม เครื่องดื่มคอมบูชาเป็นเครื่องดื่มชาหมักที่มีการศึกษาวิจัยจำนวนมากถึงประโยชน์ต่อสุขภาพ รวมถึงการป้องกันและรักษาโรค ซึ่งจากข้อมูลที่ผู้วิจัยสามารถค้นคว้าได้ในปัจจุบัน ยังไม่มีการยืนยันประโยชน์โดยตรงจากโปรไบโอติกส์ที่ได้จากการดื่มคอมบูชา แต่มาจากองค์ประกอบทางเคมีในคอมบูชาที่ผ่านกระบวนการหมักด้วยหัวเชื้อที่มีคุณภาพ ภายใต้เงื่อนไขการหมักที่เหมาะสม เช่น ระยะเวลา อุณหภูมิ ค่า pH ซึ่งสามารถทำให้เชื้อแบคทีเรียและยีสต์เจริญเติบโตและผลิตสารชีวเคมีที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย ได้แก่ วิตามิน แร่ธาตุ สารโพลีฟีนอล และกรดอินทรีย์ต่างๆ รวมถึงสารโพลีฟีนอลจากใบชา หากแต่องค์ประกอบทางเคมีเหล่านี้ก็ไม่สามารถถูกผลิตให้มีความเหมือนกันหรือมีมาตรฐานชัดเจนได้เช่นกัน ซึ่งขึ้นอยู่กับปัจจัยในการผลิต เช่น ชนิดและปริมาณของวัตถุดิบที่ใช้ ระยะเวลาและอุณหภูมิในการหมัก รวมถึงองค์ประกอบของจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่แตกต่างกันก็สามารถผลิตสารชีวเคมีในชนิดและปริมาณที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาจำนวนมากซึ่งเปรียบเทียบคุณสมบัติของเครื่องดื่มคอมบูชาก่อนและหลังการหมัก พบว่าคอมบูชาให้ประโยชน์มากกว่าน้ำชาหวานที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการหมัก เช่น มีความเข้มข้นของสารโพลีฟีนอลสูงขึ้น ทำให้สารโพลีฟีนอลมีโมเลกุลที่เล็กลง เพิ่มการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เพิ่มการดูดซึม ร่างกายสามารถนำไปใช้ได้ง่ายมากขึ้น ทำให้คอมบูชามีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่าน้ำชาทั่วไปที่ไม่ได้ผ่านการหมัก นอกจากนี้สารประกอบฟีอลในคอมบูชาก็ยังมีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก (prebiotic) ซึ่งช่วยส่งเสริมการทำงานและการเจริญเติบโตของโปรไบโอติกส์ในลำไส้อีกด้วย[14] นอกจากนี้ คอมบูชามีสภาพความเป็นกรดค่อนข้างสูง หรือมีค่า pH อยู่ในช่วงประมาณ 2.5-3.5 ซึ่งให้ประโยชน์ต่อร่างกายในการช่วยย่อยอาหาร ความเป็นกรดนี้เกิดจากกรดอินทรีย์โดยเฉพาะกรดอะซิติกที่ผลิตโดยแบคทีเรีย ซึ่งกรดอะซิติกยังจัดเป็นสารเพิ่มความเป็นด่างให้กับร่างกายด้วย เนื่องจากเมื่อผ่านกระบวนการเผาผลาญกรดอะซิติกจะถูกเปลี่ยนให้เป็นไบคาร์บอเนตในร่างกาย ซึ่งอาหารที่ช่วยรักษาความเป็นด่างในร่างกายเช่นนี้มีผลช่วยในการชะลอวัย ลดอัตราการเจ็บป่วย และอัตราการตายจากโรคเรื้อรังได้25

เนื่องจากผลการศึกษาวิจัยที่ผ่านมาพบว่ามีบางตัวอย่างของคอมบูชาที่เป็นแหล่งของโปรไบโอติกส์ ดังนั้น ซากของโปรไบโอติกส์ (paraprobiotics) หรือองค์ประกอบในผนังเซลล์ของโปรไบโอติกส์ที่ตายแล้วก็อาจเป็นประโยชน์อีกประการหนึ่งต่อสุขภาพจากการบริโภคคอมบูชา อย่างไรก็ตาม เนื่องจากซากของแบคทีเรียที่จะถูกจัดว่ามีคุณสมบัติของการเป็น paraprobitotics นั้นมีความจำเพาะเจาะจงต่อสายพันธุ์ (species or strain-specific) เช่น peptidoglycan ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของโปรไบโอติกส์สายพันธุ์ *Lactobacillus plantarun ATCC 14917* สามารถยับยั้งการ

หลังสาร interleukin-12 (IL-12) ผ่าน Toll-like receptor 2 (TLR2) ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดภูมิคุ้มกันทำลายตัวเอง และการอักเสบของลำไส้[24] เป็นต้น การศึกษาถึงประโยชน์ของการเป็น paraprobiotics ของซากแบคทีเรียที่พบในคอมบูชาจึงยังต้องมีการทำการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมต่อไป

5.2 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาชนิดของแบคทีเรียกรดอะซิติกและแบคทีเรียกรดแลคติกในตัวอย่างคอมบูชาจำนวน 6 ตัวอย่าง ด้วยวิธีวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณตำแหน่งยีน 16S rRNA พบว่าไม่พบแบคทีเรียกรดแลคติกในตัวอย่างคอมบูชาทั้ง 6 ตัวอย่าง และพบแบคทีเรียกรดอะซิติกในตัวอย่าง 4 ตัวอย่าง จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *Komagataeibacter, Acetobacter* และ *Gluconobacter* รวมทั้งสิ้น 7 สายพันธุ์ โดยสามารถระบุสายพันธุ์ที่ชัดเจนได้จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Komagataeibacter saccharivorans*, *Komagataeibacter melaceti* และ *Acetobacter musti* อีก 4 สายพันธุ์ยังไม่สามารถยืนยันสายพันธุ์ได้แน่ชัด ซึ่งต้องมีการวิเคราะห์เพิ่มเติมโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนม (whole genome sequencing) หรือลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีนอื่น หรือศึกษาลักษณะของแบคทีเรียด้วยเทคนิคอื่น เปรียบเทียบกับ Type strain ใกล้เคียงเพิ่มเติมเพื่อระบุชนิดในระดับ species แบคทีเรียกรดอะซิติกที่พบในตัวอย่างคอมบูชามากที่สุด ได้แก่ *Komagataeibacter saccharivorans* และตัวอย่างคอมบูชาที่พบชนิดของแบคทีเรียกรดอะซิติกหลากหลายมากที่สุดได้แก่ ตัวอย่าง E ซึ่งพบแบคทีเรียกรดอะซิติกทั้งสิ้น 3 ชนิด ได้แก่ *Acetobacter sp. (close to Acetobacter syzygii), Gluconobacter sp. (close to Gluconobacter oxydans)* และ *Komagataeibacter saccharivorans* โดยจากการศึกษาคุณสมบัติของการเป็นโปรไบโอติกส์เท่าที่ผู้วิจัยสามารถค้นหาข้อมูลได้ในปัจจุบัน พบว่าแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ที่พบในการศึกษานี้ไม่มีคุณสมบัติของการเป็นโปรไบโอติกส์

อย่างไรก็ตามเครื่องดื่มคอมบูชายังถูกจัดว่าเป็นเครื่องดื่มฟังก์ชัน การบริโภคคอมบูชาที่ผลิตด้วยกระบวนการผลิตและวัตถุดิบที่มีคุณภาพจะทำให้ผู้บริโภคได้รับประโยชน์จาก ค่า pH ในคอมบูชาที่เหมาะสำหรับการช่วยย่อยอาหาร และองค์ประกอบทางเคมีในคอมบูชาที่เกิดจากการหมักของเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ รวมถึงวัตถุดิบที่ใช้ในการหมัก เช่น ใบชา สมุนไพร และเครื่องเทศ เป็นต้น

5.3 ข้อเสนอแนะ

5.3.1 ข้อเสนอแนะสำหรับผู้ผลิตเพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาคุณภาพผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มคอมบูชา

แม้ว่าการผลิตเครื่องดื่มคอมบูชาจะไม่สามารถผลิตให้ได้มาตรฐานที่เหมือนกันในทุกล็อตการผลิต หรือแม้กระทั่งเครื่องดื่มที่ผลิตในล็อตการผลิตเดียวกัน ก็ไม่อาจคงคุณภาพให้เหมือนเดิมได้ตลอดกระบวนการตั้งแต่เมื่อบรรจุน้ำหมักคอมบูชาลงขวดผลิตภัณฑ์จนกระทั่งส่งถึงมือผู้บริโภค การเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพและกายภาพสามารถเกิดขึ้นได้ตลอดเวลาตามปัจจัยที่กล่าวไว้ข้างต้นในการศึกษานี้ อย่างไรก็ตามผู้ผลิตสามารถพัฒนากระบวนการผลิตเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพและน่าเชื่อถือได้ ดังต่อไปนี้

5.3.1.1 ระบุข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อผู้บริโภคบนฉลากผลิตภัณฑ์ให้ถูกต้องและชัดเจน

- ระบุวันที่ผลิตและวันหมดอายุ
- ระบุระยะเวลาในการหมัก
- ระบุชนิดของวัตถุดิบที่ใช้ในการหมัก
- ระบุข้อแนะนำในการจัดเก็บผลิตภัณฑ์ เช่น อุณหภูมิที่เหมาะสมในการจัดเก็บ
- ไม่ระบุคำกล่าวอ้างว่ามีโปรไบโอติกส์บนฉลากเครื่องดื่มคอมบูชา โดยไม่มีการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ที่เป็นโปรไบโอติกส์ก่อนการจำหน่าย

5.3.1.2 พัฒนาคุณภาพของน้ำหัวเชื้อคอมบูชา โดยการคัดเลือกและผสมผสานสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ให้มีคุณสมบัติตามที่ต้องการ เช่น

- การเร่งกระบวนการหมักคอมบูชาให้เร็วขึ้น โดยการผสมผสานจุลินทรีย์สายพันธุ์หลัก 3 สายพันธุ์ ได้แก่ แบคทีเรียสายพันธุ์ *Acetobacter pasteurianus*, *Komagataeibacter xylinus* และ ยีสต์สายพันธุ์ *Zygosaccharomyces bailii* [14]
- เพื่อให้ได้สารเมตาบอไลท์ที่ต้องการจากกระบวนการหมัก เช่น กรดกลูคูโรนิก โดยใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ *Komagataeibacter intermedius KN89* ผสมกับยีสต์สายพันธุ์ *Dekkera bruxellensis KN89* ในอัตราส่วน 6:4 [14]
- การเติมสายพันธุ์แบคทีเรียที่ได้มีการศึกษาและรับรองว่าเป็นโปรไบโอติกส์ลงไปในกระบวนการหมักคอมบูชาเพื่อพัฒนาคุณภาพให้เกิดประโยชน์และมีคุณสมบัติในการป้องกันและรักษาโรค เช่น ผลการวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าการเติมแบคทีเรียสายพันธุ์ *Lactobacillus fermentum* และ *Lactobacillus delbruekii* ในกระบวนการหมักคอมบูชา ช่วยลดค่าน้ำตาลและไขมันในเลือด รวมถึงค่าเอนไซม์ตับ ALT, AST และ ALP ในหนูทดลองได้เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม[14]

- สำหรับผู้ผลิตที่ขึ้นทะเบียน อ.ย. จำเป็นต้องผ่านกระบวนการพลาสเจอไรซ์เพื่อให้เป็นไปตามมาตรฐานในการควบคุมจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค สามารถเติมจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่เป็นโปรไบโอติกส์ที่ได้รับการอนุญาตจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ดังมีรายชื่อสายพันธุ์ที่ได้รับอนุญาตในประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่อง หลักเกณฑ์และแนวทางปฏิบัติการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหาร เช่น แบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus coagulan* และ *Lactobacillus rhamnosus* เป็นต้น โดยศึกษาคุณสมบัติก่อนนำมาใช้ว่าสามารถมีชีวิตรอด และทำงานได้ดีในคอมบูชา ที่มีค่า pH ต่ำ และสามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ในสภาพอากาศของประเทศไทย

5.3.1.3 ควบคุมกระบวนการผลิตเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพ

- การเลือกใช้วัตถุดิบที่มีคุณภาพ เช่น ใบชา และน้ำตาลออแกนิก

- การควบคุมคุณภาพของหัวเชื้อ ไม่ใช้การต่อน้ำหัวเชื้อเดิมต่อเนื่องนานๆ ควรมีการปรับปรุงและตรวจสอบคุณภาพน้ำหัวเชื้อที่ใช้ในการผลิตคอมบูชาอย่างสม่ำเสมอ

- การใช้ระยะเวลาในการหมักที่เหมาะสม

- การควบคุมการผลิตให้ถูกสุขอนามัย ปลอดเชื้อ ทำการฆ่าเชื้ออุปกรณ์และสถานที่ผลิตสม่ำเสมอ ให้เป็นไปตามมาตรฐานการผลิตอาหาร เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรค

- เนื่องจากน้ำหมักคอมบูชามีสภาพความเป็นกรดสูง ควรเลือกภาชนะที่ใช้ในการหมักและบรรจุภัณฑ์ที่เหมาะสมเพื่อป้องกันอันตรายจากการปนเปื้อนของสารที่ถูกกัดกร่อนในเครื่องดื่ม เช่น Microplastics เป็นต้น

5.3.2 ข้อเสนอแนะสำหรับผู้บริโภค

- เลือกซื้อผลิตภัณฑ์คอมบูชาที่มีรายละเอียดระบุบนฉลากชัดเจน เช่น วันที่ผลิต วันหมดอายุ จำนวนวันในการหมัก วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต เป็นต้น

- ทำความเข้าใจว่าประโยชน์ที่ได้จากการดื่มคอมบูชาไม่ได้มาจากโปรไบโอติกส์โดยตรง แต่มาจากองค์ประกอบทางเคมีในคอมบูชาที่เกิดจากการหมักของเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ รวมถึงวัตถุดิบที่ใช้ในการหมัก เช่น ใบชา สมุนไพร และเครื่องเทศ เป็นต้น

5.3.3 ข้อเสนอแนะสำหรับการศึกษาวิจัยครั้งต่อไป

- ศึกษาเกี่ยวกับชนิด สายพันธุ์ และจำนวนของยีสต์

เนื่องจากการศึกษานี้มุ่งศึกษาชนิด และสายพันธุ์ของแบคทีเรียเพื่อเติมเต็มช่องว่างทางความรู้เกี่ยวกับคุณสมบัติและศักยภาพของการเป็นเครื่องดื่มโปรไบโอติกส์ดังที่มีการกล่าวอ้างบนฉลากเครื่องดื่มคอมบูชาหลายยี่ห้อที่วางจำหน่ายในท้องตลาด ผลการศึกษาของงานวิจัยนี้พบว่า

แบคทีเรียที่พบในผลิตภัณฑ์คอมบูชาพร้อมดื่มที่ทำการศึกษาไม่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกส์ ดังนั้นเพื่อให้สามารถสรุปได้ถึงคุณสมบัติดังกล่าวจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับชนิด สายพันธุ์ และจำนวนยีสต์ด้วยเช่นกัน

- ศึกษาชนิดและปริมาณของแบคทีเรียในน้ำหมักคอมบูชา โดยเปรียบเทียบในวันที่บรรจุขวด และช่วงระยะเวลาหลังบรรจุขวด เช่น 1, 2 และ 3 เดือน โดยควบคุมอุณหภูมิในการจัดเก็บเพื่อศึกษาอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียในระยะเวลาหลังการจัดเก็บผลิตภัณฑ์

- ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในผลิตภัณฑ์คอมบูชา

เนื่องจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าในตัวอย่างคอมบูชาส่วนใหญ่มักไม่พบจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกส์หรืออาจพบได้ในปริมาณที่น้อยมาก โดยปัจจัยที่ทำให้เครื่องดื่มคอมบูชามีประโยชน์ต่อสุขภาพคือองค์ประกอบทางเคมีในน้ำหมักคอมบูชา ดังนั้น ผู้วิจัยจึงมีข้อเสนอแนะว่าควรมีการศึกษาเกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมี เช่น กรดอินทรีย์ วิตามิน แร่ธาตุ และสารโพลีฟีนอล ในผลิตภัณฑ์คอมบูชาพร้อมดื่มที่วางจำหน่ายในท้องตลาดเพื่อเป็นตัวชี้วัดคุณภาพของผลิตภัณฑ์

บรรณานุกรม

1. Grand View Research. Kombucha Market Size, Share & Trends Analysis Report By Flavor (Original, Flavored), By Distribution Channel (Supermarkets, Health Stores, Online Stores), By Region, And Segment Forecasts, 2020 – 2027. 2020, Available from https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/kombucha-market
2. Kombucha Brewers International. World Kombucha Day FAQ's [Internet]. 2021, Available from https://worldkombuchaday.com/about/
3. Kapp JM, Sumner W. Kombucha: A Systematic Review of the Empirical Evidence of Human Health Benefit, Annals of Epidemiology (2018), doi: https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2018.11.001.
4. Mousavi, S. M., Hashemi, S. A., Zarei, M., Gholami, A., Lai, C. W., Chiang, W. H., … Mazraedoost, S. (2020). Recent Progress in Chemical Composition, Production, and Pharmaceutical Effects of Kombucha Beverage: A Complementary and Alternative Medicine. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2020, 1–14. doi:10.1155/2020/4397543
5. Singh VP, Sharma J, Babu S, Rizwanulla, Singla A. Role of probiotics in health and disease: a review. J Pak Med Assoc. 2013 Feb;63(2):253-7. PMID: 23894906.
6. Sánchez, B., Delgado, S., Blanco-Míguez, A., Lourenço, A., Gueimonde, M., & Margolles, A. (2016). Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. Molecular Nutrition & Food Research, 61(1), 1600240. doi:10.1002/mnfr.201600240
7. Mörkl, S., Butler, M.I., Holl, A. et al. Probiotics and the Microbiota-Gut-Brain Axis: Focus on Psychiatry. Curr Nutr Rep 9, 171–182 (2020). https://doi.org/10.1007/s13668-020-00313-5
8. Jayabalan R, Malbaša RV, Lončar ES, Vitas JS, Sathishkumar M. A Review on Kombucha Tea-Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus. Compr Rev Food Sci Food Saf. 2014 Jul;13(4):538-550. doi: 10.1111/1541-4337.12073. PMID: 33412713.
9. Emiljanowicz KE, Malinowska-Pańczyk E. Kombucha from alternative raw materials - The review. Crit Rev Food Sci Nutr. 2020;60(19):3185-3194. doi: 10.1080/10408398.2019.1679714. Epub 2019 Oct 28. PMID: 31657623.

10. Digută CF, Nitoi GD, Matei F, Lută G, Cornea CP. The Biotechnological Potential of *Pediococcus* spp. Isolated from Kombucha Microbial Consortium. Foods. 2020 Dec 1;9(12):1780. doi: 10.3390/foods9121780. PMID: 33271757; PMCID: PMC7760545.
11. Tran T, Grandvalet C, Verdier F, Martin A, Alexandre H, Tourdot-Maréchal R. Microbiological and technological parameters impacting the chemical composition and sensory quality of kombucha. Compr Rev Food Sci Food Saf. 2020 Jul;19(4):2050-2070. doi: 10.1111/1541-4337.12574. Epub 2020 Jun 2. PMID: 33337078.
12. Villarreal-Soto SA, Beaufort S, Bouajila J, Souchard JP, Taillandier P. Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. J Food Sci. 2018 Mar;83(3):580-588. doi: 10.1111/1750-3841.14068. PMID: 29508944.
13. Ivanišová E, Meňhartová K, Terentjeva M, Harangozo Ľ, Kántor A, Kačániová M. The evaluation of chemical, antioxidant, antimicrobial and sensory properties of kombucha tea beverage. J Food Sci Technol. 2020 May;57(5):1840-1846. doi: 10.1007/s13197-019-04217-3. Epub 2019 Dec 16. PMID: 32327794; PMCID: PMC7171019.
14. Vargas, B. K., Fabricio, M. F., & Záchia Ayub, M. A. (2021). Health effects and probiotic and prebiotic potential of Kombucha: A bibliometric and systematic review. Food Bioscience, 101332. doi:10.1016/j.fbio.2021.101332
15. B. Shruthi, N. Deepa, Rakesh Somashekaraiah, G. Adithi, S. Divyashree, M Y Sreenivasa, Exploring biotechnological and functional characteristics of probiotic yeasts: A review, Biotechnology Reports, Volume 34, 2022, e00716, ISSN 2215-017X, https://doi.org/10.1016/j.btre.2022.e00716.
16. Marsh AJ, O'Sullivan O, Hill C, Ross RP, Cotter PD. Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. Food Microbiol. 2014 Apr;38:171-8. doi: 10.1016/j.fm.2013.09.003. Epub 2013 Sep 25. PMID: 24290641.
17. De Filippis, F., Troise, A.D., Vitaglione, P., Ercolini, D., Different temperatures select distinctive acetic acid bacteria species and promotes organic acids production during Kombucha tea fermentation, Food Microbiology (2018), doi: 10.1016/j.fm.2018.01.008

18. Greenwalt CJ, Steinkraus KH, Ledford RA. Kombucha, the fermented tea: microbiology, composition, and claimed health effects. J Food Prot. 2000 Jul;63(7):976-81. doi: 10.4315/0362-028x-63.7.976. PMID: 10914673.
19. Villarreal-Soto SA, Bouajila J, Pace M, Leech J, Cotter PD, Souchard JP, Taillandier P, Beaufort S. Metabolome-microbiome signatures in the fermented beverage, Kombucha. Int J Food Microbiol. 2020 Nov 16;333:108778. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108778. Epub 2020 Jul 9. PMID: 32731153.
20. Tan LL, Tan CH, Ng NKJ, Tan YH, Conway PL, Loo SCJ. Potential Probiotic Strains From Milk and Water Kefir Grains in Singapore-Use for Defense Against Enteric Bacterial Pathogens. Front Microbiol. 2022 Apr 1;13:857720. doi: 10.3389/fmicb.2022.857720. PMID: 35432232; PMCID: PMC9011154.
21. Abol-Fotouh D, Hassan MA, Shokry H, Roig A, Azab MS, Kashyout AEB. Bacterial nanocellulose from agro-industrial wastes: low-cost and enhanced production by Komagataeibacter saccharivorans MD1. Sci Rep. 2020 Feb 26;10(1):3491. doi: 10.1038/s41598-020-60315-9. PMID: 32103077; PMCID: PMC7044201.
22. Gayathri G, Srinikethan G. Bacterial Cellulose production by K. saccharivorans BC1 strain using crude distillery effluent as cheap and cost effective nutrient medium. Int J Biol Macromol. 2019 Oct 1;138:950-957. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.07.159. Epub 2019 Jul 26. PMID: 31351957.
23. Lavasani PS, Motevaseli E, Sanikhani NS, Modarressi MH. Komagataeibacter xylinus as a novel probiotic candidate with high glucose conversion rate properties. Heliyon. 2019 Apr 28;5(4):e01571. doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e01571. PMID: 31183432; PMCID: PMC6488717.
24. Teame Tsegay, Wang Anran, Xie Mingxu, Zhang Zhen, Yang Yalin, Ding Qianwen, Gao Chenchen, Olsen Rolf Erik, Ran Chao, Zhou Zhigang. Paraprobiotics and Postbiotics of Probiotic Lactobacilli, Their Positive Effects on the Host and Action Mechanisms: A Review. Frontiers in Nutrition. Volume 7, 2020. doi:10.3389/fnut.2020.570344

25. Schwalfenberg GK. The alkaline diet: is there evidence that an alkaline pH diet benefits health? J Environ Public Health. 2012;2012:727630. doi: 10.1155/2012/727630. Epub 2011 Oct 12. PMID: 22013455; PMCID: PMC3195546.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ขั้นตอนการคัดแยกและวิเคราะห์ชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มกรดอะซิติก และกลุ่มกรดแลคติกในคอมบูชาด้วยวิธี 16S rRNA Sequencing of Culturable Bacteria

การศึกษาปริมาณและคัดแยกแบคทีเรียผลิตกรดแอซิติก และแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก ที่ พบในตัวอย่างเครื่องดื่มคอมบูชะ ศึกษาปริมาณแบคทีเรียผลิตกรดแอซิติก และแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกในตัวอย่างโดยวิธี spread plate โดยดูดตัวอย่างที่ได้จากข้อ 6.1 ปริมาตร 10 ml ลงในตัวอย่าง Buffered Peptone water ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจะได้ความเข้มข้นตัวอย่างที่อัตราส่วน 1:10 จากนั้นเจือจาง ตัวอย่างตามลำดับๆ ละ 10 เท่า (serial ten-fold dilutions) ด้วยสารละลายสำหรับเจือจาง Buffered Peptone water โดยปิเปตตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ในสารละลายสำหรับเจือจาง 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จะได้ตัวอย่างเจือจาง 1:10 (initial suspension หรือ primary dilution) จากนั้นปิเปต ตัวอย่างที่เจือจาง 1:10 มา 1 มิลลิลิตร ใส่ในสารละลายสำหรับเจือจาง 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จะ ได้ตัวอย่างเจือจาง 1:100 ทำเช่นนี้ต่อไปจนได้ตัวอย่างที่เจือจางตามต้องการ จากนั้นดูดสารละลาย ตัวอย่างที่ได้ในแต่ละระดับการเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ GECA ที่มี cycloheximide 50 µg/ml สำหรับคัดแยกแบคทีเรียผลิตกรดแอซิติก และอาหารเลี้ยง เชื้อ MRS ที่มี0.7% (w/v) $CaCO_3$ และ cycloheximide 50 µg/ml สำหรับคัดแยกแบคทีเรียผลิต กรดแลคติก ระดับความเจือจางละ 2 จานเพาะเชื้อ (duplicate) เกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วผิวหน้าอาหารด้วยแท่งเกลี่ยเชื้อ (spreader) จนกระทั่งผิวหน้าของวุ้นแห้ง จากนั้นนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 2 วัน ตรวจนับจำนวนของแบคทีเรียที่มีโซนใสรอบโคโลนี และนำมาคำนวน ปริมาณแบคทีเรียผลิตกรดแอซิติก และแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกที่พบในตัวอย่าง จากนั้นคัดแยกแบคทีเรียผลิตกรดแอซิติก และแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกที่พบในตัวอย่าง โดย คัดเลือกโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนีแตกต่างกัน (รวมประมาณ 20 ไอโซเลต) มาคัดแยกเชื้อให้บริสุทธิ์สำหรับนำไปเตรียมตัวอย่างหาลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ 16S rRNA gene เพื่อใช้ในการระบุชนิดแบคทีเรียที่คัดแยกได้ต่อไป

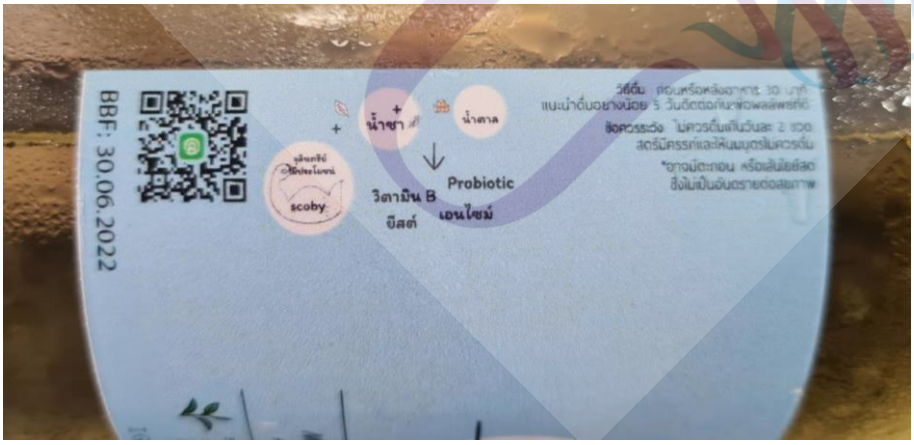
การระบุชนิดแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างคอมบูชะโดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ 16S rRNA gene นำแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างคอมบูชะมาศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA เพื่อระบุชนิดแบคทีเรีย [8] โดยนำเซลล์แบคทีเรียที่คัดแยกได้มาสกัดดีเอ็นเอด้วย Genomic DNA Extraction Kit Miniprep Blood/Cultured Cell (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan) จากนั้นเพิ่ม จำนวนของดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ด้วย Primers 20F (5’ GAG TTT GAT CCT GC TCA G 3’) และ 1500R (5’ GTT ACC TTG TTA CGA CTT 3’) ซึ่งเป็น universal primers สำหรับเพิ่มจำนวน 16S rDNA ของแบคทีเรีย โดยเตรียมปฏิกริยาเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (PCR) ที่ประกอบด้วย primers 20F และ 1500R อย่างละ 40 pmol, dNTPs 20 mM, 1xTaq buffer, $MgCl_2$ 200 mM, Taq

DNA polymerase 2.5 Units และดีเอ็นเอของแบคทีเรีย 50-200 ng ในปฏิกริยา PCR 100 µl จากนั้นดำเนินการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยปฏิกริยาดังนี้ 1) Pre-denaturing 94°C นาน 3 นาที 2) denaturing 94°C นาน 1 นาที 3) annealing 50°C นาน 1 นาที 4) extension 72°C นาน 2 นาที 5) ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 - 4 รวม 25 รอบ 6) final extension 72°C นาน 3 นาที ตรวจสอบผลการเพิ่ม จำนวนดีเอ็นเอด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis โดยขนาดของดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้ควรมี ขนาดประมาณ 1,500 bp นำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกริยาการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (PCR product) มาทำ ให้บริสุทธิ์ด้วย Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan) และ ตรวจสอบความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้ด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis และ Nanodrop® spectrophotometer model ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc., USA) จากนั้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ด้วย primer 800R (5’ TAC CAG GGT ATC TAA TCC 3’) และ primer 518F (5’ CCA GCA GCC GCG GTA ATA CG 3’) ซึ่งเมื่อได้ผล ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียแล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์และเปรียบเทียบความ เหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล ezbiocloud (https://www.ezbiocloud.net/) เพื่อ ระบุชนิดของแบคทีเรีย

ภาคผนวก ข

ฉลากตัวอย่างผลิตภัณฑ์คอมบูชาที่ใช้ในงานวิจัย

ฉลากผลิตภัณฑ์คอมบูชา A

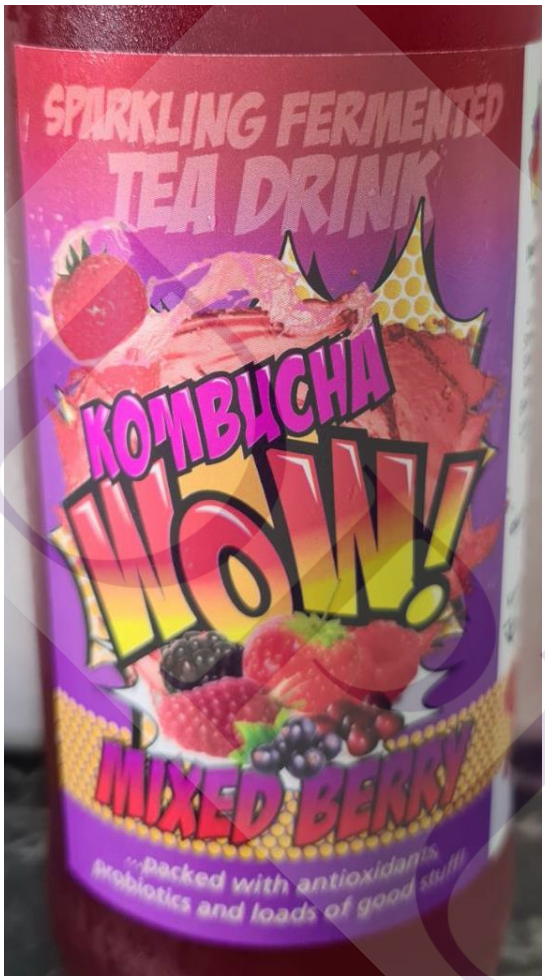


ฉลากผลิตภัณฑ์คอมบูชา B

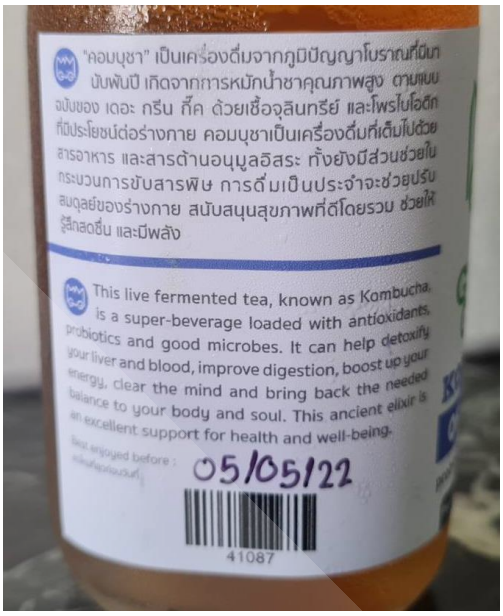
ฉลากผลิตภัณฑ์คอมบูชา C

ฉลากผลิตภัณฑ์คอมบูชา D

ฉลากผลิตภัณฑ์คอมบูชา E



ฉลากผลิตภัณฑ์คอมบูชา F



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	วิภาวี วัฒนวิทย์
การศึกษา	บริหารธุรกิจบัณฑิต สาขาการจัดการธุรกิจระหว่างประเทศ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2551
ตำแหน่งงาน	ผู้จัดการฝ่ายบัญชีและการเงิน บริษัท รวมเจริญมาร์เก็ตติ้ง จำกัด

DPU