วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ปีที่ 28 (ฉบับที่ 1) มกราคม – เมษายน พ.ศ. 2566
BURAPHA SCIENCE JOURNAL Volume 28 (No.1) January – April 2023 บทความวิจัย

บทบาทของการใช้คลื่นอัลตร้าโซนิคต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตชาดำคอมบูชา

Role of Ultrasonic-assisted Fermentation on Kombucha Black Tea Process Enhancements

วรลักษณ์ สุริวงษ์[1], สมเกียรติ จตุรงค์ล้ำเลิศ[2*], ชานันดา ธิน่าน[2] และ ฐาปนี จงหวัง[2]

Voraluck Suriwong[1], Somkiat Jaturonglumlert[2*], Chananda Thinan[2] and Thapanee Chongwang[2]

[1] *หลักสูตรสาขาวิชาวิศวกรรมอาหาร คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอาหาร มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม*

[2] *สาขาวิชาวิศวกรรมอาหาร คณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้*

[1]*Agricultural and Food Engineering, Faculty of Food and Agricultural Technology, Pibulsongkram Rajabhat University*

[2]*Division of Food Engineering, Faculty of Engineering and Agro-industry, Maejo University*

Received : 4 April 2022

Revised : 19 May 2022

Accepted : 19 August 2022

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการใช้คลื่นอัลตราโซนิคในระหว่างกระบวนการหมักชาดำคอมบูชาที่มีต่อลักษณะจลพลศาสตร์ของปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดอะซิติก ระยะเวลาการหมัก คุณภาพทางกายภาพและทางเคมี รวมถึงปริมาณยีสต์ที่ได้ อัตราส่วนที่เหมาะสมในการหมักชาคอมบูชาด้วยชาดำปริมาณ 1 ลิตร ได้จากชาดำสัดส่วน 3 กรัมต่อลิตร น้ำตาล 10% (w/v) และหัวเชื้อสกูบี้ 10% (v/v) ที่อุณหภูมิห้อง จะได้น้ำชาหมักคอมบูชาที่ผลิตจากชาดำที่มีรสชาติที่ดีเมื่อระยะเวลาหมัก 8-11 วัน โดยมีค่าพีเอชสุดท้ายเท่ากับ 3.30±0.303 และปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดอะซิติกสูงถึง 4.25±0.110 กรัมต่อลิตร ผลของการใช้คลื่นอัลตราโซนิคที่มีต่อระยะเวลาการหมัก คุณภาพทางกายภาพและทางเคมีของชาหมักคอมบูชา พบว่า เมื่อทรีทด้วยคลื่นอัลตร้าโซนิคที่เวลานานขึ้นจะช่วยลดระยะเวลาการหมักชาคอมบูชาให้สั้นลงถึงร้อยละ 60 หรือใช้เวลาการหมักเพียง 5 วัน เมื่อทรีทด้วยคลื่นอัลตราโซนิคแบบรอบสั่น-หยุดเป็นเวลา 30 นาทีต่อวัน โดยไม่ส่งผลต่อลักษณะสีของน้ำชาคอมบูชา และสามารถอธิบายลักษณะการเปลี่ยนแปลงของปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติกได้ด้วยสมการเอกซ์โพเนนเชียล $A = A_0 e^{-kt}$ ที่ค่า R^2 ในช่วง 0.96 – 0.99 ทั้งนี้คุณสมบัติต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักย่อมแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของหัวเชื้อสกูบี้และสภาพแวดล้อมที่เกิดขึ้นขณะทำการหมักชาคอมบูชา

คำสำคัญ : คอมบูชา ; ชาดำ ; คลื่นอัลตร้าโซนิค ; การหมัก

Abstract

This research aimed to study effects of ultrasonic waves on the fermentation process of black tea kombucha. Kinetics of TA during kombucha fermentation, fermentation time, physical and chemical properties of kombucha black tea and the number of yeasts were studied. It was found that the appropriate ratio for 1 Litre of kombucha fermentation at room temperature was 3 g/L of black tea, 10%(w/v) of sugar and 10%(v/v) of scoby. By using the appropriate ratio, the good taste kombucha black tea would obtained from 8 – 11 days of fermentation time with final pH 3.30±0.303 and total acid (in terms of acetic acid) of 4.25±0.110 g/L. In addition, the effect of ultrasonic waves on the fermentation time, the physical and chemical properties of kombucha tea showed that the longer the ultrasonic treatment, the shorter the fermentation time of kombucha tea without color changes of black tea kombucha. The shortest fermentation time occurred in the black tea kombucha fermentation with the ultrasonic treatment of US pulse-US pause 30 mins per day (60%). The kinetics of TA during the fermentation of black tea kombucha could be well explained by exponential equation; $A = A_0 e^{-kt}$ with R^2 of 0.96 – 0.99. However, properties changes during fermentation depended on source of scoby and fermentation condition.

Keywords : kombucha ; black tea ; ultrasonic ; fermentation

***Corresponding author. E-mail** : yaidragon@mju.ac.th

บทนำ

ชาเป็นเครื่องดื่มชนิดหนึ่งที่นิยมบริโภคกันทั่วโลก ตามบันทึกทางประวัติศาสตร์ชาวจีนได้ทำการปลูกและใช้ต้นชามานานกว่า 3,000 ปี ชาได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวางว่าเป็นเครื่องดื่มประจำวันในประเทศจีนและในหลายประเทศ ตั้งแต่สมัยโบราณชาถูกใช้เป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพหรือยาเพื่อป้องกันรักษาโรคต่าง ๆ (Yan *et al*., 2020) พัฒนาการของอารยธรรมและบทบาทของอาหารและการแพทย์พื้นบ้าน มักจะพบว่า มีการใช้อาหารและเครื่องดื่มหลายชนิดเพื่อให้เกิดผลดีต่อสุขภาพ ชามีคุณสมบัติในการกระตุ้นและล้างพิษในการกำจัดแอลกอฮอล์และสารพิษเพื่อปรับปรุงการไหลเวียนของเลือดและปัสสาวะ บรรเทาอาการปวดข้อและเพิ่มความต้านทานต่อโรค (Dufresne & Farnworth, 2000)

เครื่องดื่มชาที่เรียกว่า ชาคอมบูชา (Kombucha tea) คือ ชาที่ได้จากการหมักจากการใช้น้ำตาลและหัวเชื้อสกูบี้ (SCOBY : Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast) เป็นส่วนผสมในการหมัก หัวเชื้อสกูบี้ คือ ฟิล์มชีวภาพที่ได้จากความสัมพันธ์ทางชีวภาพของแบคทีเรียและยีสต์หลายชนิดที่ก่อประโยชน์ ไม่เป็นอันตรายต่อร่างกาย นอกจากนี้ยังพบว่าชาหมักคอมบูชาเป็นเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพและรักษาโรคต่าง ๆ มากมาย เช่น การล้างสารพิษในตับ กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันและป้องกันโรคมะเร็ง เป็นต้น ประโยชน์เหล่านี้เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระของคอมบูชา โดยพบว่าในผลิตภัณฑ์หมักนี้ผลิตโพลิฟีนอล (Jafari *et al*., 2020) ซึ่งเป็นสารที่มีสมบัติในการต่อต้านอนุมูลอิสระและมีส่วนช่วยรักษาสมดุลในร่างกาย และชะลอความเสื่อมของระบบประสาท หลอดเลือดสมอง โรคหัวใจและหลอดเลือดได้เป็นอย่างดี

คลื่นอัลตราโซนิค (Ultrasonic waves) คือ พลังงานที่เกิดจากคลื่นเสียงที่มีการสั่นของคลื่นประมาณ 20,000 ครั้งต่อวินาทีหรือสูงกว่า (Mason, 1998) หรือหมายถึงคลื่นความดัน (Pressure waves) ที่มีความถี่ (Frequency) สูงกว่าคลื่นเสียงปกติ (สูงกว่า 20,000 กิโลเฮิร์ตซ์, kHz) โดยทั่วไปจะมีการใช้อัลตร้าโซนิคกำลังสูงและความถี่ต่ำ หรือ High power and low frequencies หรือที่เรียกว่า พาวเวอร์อัลตร้าโซนิค (Power ultrasonic) ซึ่งมักนำมาประยุกต์ใช้ในกระบวนการแปรรูปอาหาร (Mason, 1998) ในแง่ของกระบวนการหมักได้มีการศึกษาการใช้คลื่นอัลตร้าโซนิคในการเพิ่มอัตราการหมัก ลดระยะเวลาการหมัก อัตราการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในระหว่างกระบวนการหมัก รวมถึงลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ แต่ยังไม่มีการนำมาประยุกต์ใช้ศึกษาในกระบวนการหมักชาคอมบูชา (Al Daccache *et al*., 2020; Huezo *et al*., 2019; Ojha *et al*., 2017; Pawar & Rathod, 2020)

ในการเพิ่มประสิทธิภาพของการหมักชาคอมบูชานั้น ปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อคุณภาพน้ำชาหมักคอมบูชา คือ รสชาติ และปัจจัยที่ส่งผลต่อรสชาติของน้ำชาหมักคอมบูชา คือ ค่าพีเอช (pH) จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า ค่าพีเอชที่ยอมรับได้ควรอยู่ในช่วง 2.50 – 3.50 (Liu *et al*., 1996; Gray, 2019) โดยสภาวะที่ค่าพีเอชต่ำนี้ จะทำให้แบคทีเรียที่ทำให้สุขภาพดีเจริญได้ดี ทำลายแบคทีเรียที่เป็นอันตราย และทำให้สกูบี้มีชีวิตอยู่ได้ ทำให้เราได้รับสารอาหารโปรไบโอติกส์ทั้งหมดโดยไม่มีอันตรายใด ๆ แต่ทั้งนี้ไม่ควรให้สภาวะการหมักมีค่าพีเอชต่ำกว่า 2.50 เพราะสภาวะที่เป็นกรดอาจทำลายสุขภาพได้ รวมถึงหากระดับพีเอชที่สูงขึ้นอาจกลายเป็นแหล่งเพาะพันธุ์สำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ นอกจากนี้ มีงานวิจัยที่เคยศึกษาถึงระยะเวลาการหมักชาคอมบูชาให้ได้รสชาติดี โดยพิจารณาจากค่าพีเอชและปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดอะซิติก แต่การใช้ร่วมกับคลื่นอัลตร้าโซนิค ยังถือว่าเป็นเรื่องที่ยังไม่เคยมีการนำมาประยุกต์ใช้เพื่อพัฒนากระบวนการผลิตชาดำคอมบูชา รวมถึงยังขาดข้อมูลในการพยายามอธิบายกระบวนการหมักชาดำคอมบูชาร่วมกับสมการทางคณิตศาสตร์เพื่อ

ประยุกต์ใช้ในการออกแบบกระบวนการผลิตชาดำคอมบูชาให้มีประสิทธิภาพที่ดีที่สุดอีกด้วย ดังนั้น ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาผลของการใช้คลื่นอัลตร้าโซนิคที่มีต่อจลพลศาสตร์การเกิดกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติก ระยะเวลาการหมัก รวมถึงคุณภาพทางกายภาพและทางเคมี เพื่อให้ได้น้ำชาคอมบูชาที่มีคุณภาพและรสชาติที่ดีขึ้น เพื่อเป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการออกแบบกระบวนการทำชาดำคอมบูชาให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นในอนาคตต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. กระบวนการเตรียมชาดำหมักคอมบูชา

ชาดำหมักคอมบูชาปริมาตร 1 ลิตร เตรียมจากชาดำยี่ห้อ มายช้อยส์ (Central Food Retail Co., Ltd., ตำบลท่าศาลา อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่) ปริมาณ 3 กรัม ต่อการต้มในน้ำ 100 องศาเซลเซียส ปริมาตร 1 ลิตร (Figure 1) โดยแช่ชาในน้ำเดือดนาน 5-10 นาที แล้วจึงกรองผ่านกระชอนที่มีผ้าขาวบางรองอีกชั้น บรรจุน้ำชาลงในขวดแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (ขวดแก้วและอุปกรณ์ที่ใช้ในกระบวนการหมักผ่านการต้มฆ่าเชื้อในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที) จากนั้นละลายน้ำตาลทรายขาวในน้ำชาร้อนปริมาณ 100 กรัม หรือร้อยละ 10 (w/v) คนจนน้ำตาลละลายจนหมด ทิ้งให้น้ำชาเย็นตัวลงที่อุณหภูมิห้องจึงเติมหัวเชื้อทางการค้า (SCOBY) ปริมาณร้อยละ 10 (w/v) พร้อมน้ำหมักเดิมผสมลงไปในปริมาณ 150 กรัม ทำการปิดฝาขวดแก้วด้วยผ้าขาวบางสะอาด และรัดด้วยเชือกให้สนิท บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) ในที่มืดเป็นเวลา 21 วัน (Cvetkovic *et al*., 2008; Jayabalan *et al*., 2008; Sirisa-ard *et al*., 2015)

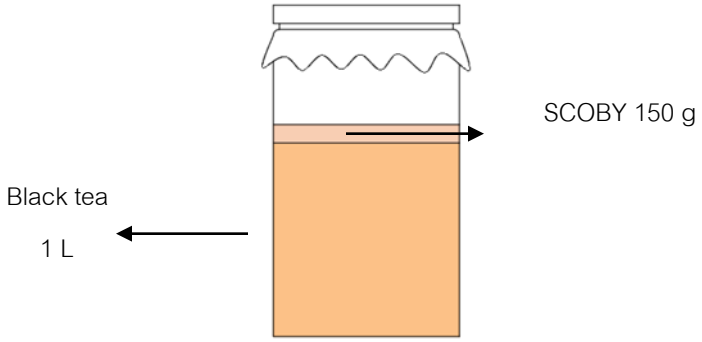

Figure 1 Experimental set-up of control fermentation

2. การศึกษาผลของการใช้คลื่นอัลตร้าโซนิค

บ่มตัวอย่างชาดำหมักคอมบูชาตามขั้นตอนการเตรียมชาดำหมักคอมบูชาข้างต้น แยกเป็น 2 สภาวะ คือ สภาวะควบคุมโดยบ่มที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) และสภาวะทรีทด้วยคลื่นอัลตร้าโซนิค

การทรีทด้วยอัลตร้าโซนิค ด้วยเครื่อง Ultrasonic cleaner รุ่นJP-040S โดยวางขวดตัวอย่างลงในเครื่องอัลตร้าโซนิค ทำการทรีทด้วยคลื่นอัลตร้าโซนิคแบบรอบสั่น-หยุด ที่ความถี่ 40 kHz แบ่งรอบการทรีทด้วยระบบ US pulse-US pause หรือ

แบบสั่น-หยุด เป็น 3 ระดับเวลา คือ US pulse-US pause แบบต่อเนื่องที่ 10, 20 และ 30 นาทีต่อวัน โดยในรอบของการสั่นจะใช้ระบบการสั่นเป็นเวลา 30 วินาที และหยุดสั่นเป็นเวลา 30 วินาที สลับกันต่อเนื่องจนครบตามรอบเวลาที่กำหนดข้างต้น (Al Daccache *et al.*, 2020) ดังแสดง Table 1 และ Figure 2 ทำการหมักชาและตั้งชาทิ้งไว้ในสภาวะอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส และทำการวัดค่าองค์ประกอบทางเคมีและกายภาพทุกวันเป็นเวลา 14 วัน

Table 1 The designed ultrasonic treatment during fermentation of black tea kombucha

Treat no.	Total time of ultrasonic treatment per day (min)	Period of US pulse (sec)	Period of US pause (sec)
1	10	30	30
2	20	30	30
3	30	30	30

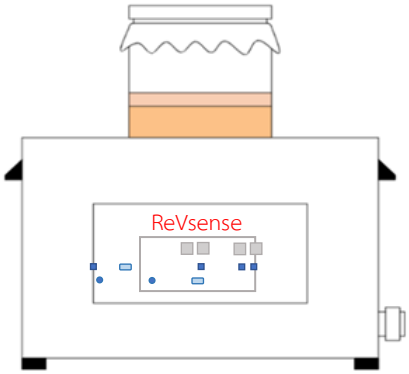

Figure 2 Schematic diagram of ultrasonic treatment with black tea kombucha

3. การศึกษาจลพลศาสตร์ การวิเคราะห์และการเก็บข้อมูลด้านคุณภาพ

ในการศึกษาครั้งนี้ตัวแปรที่ทำการศึกษา ได้แก่ ค่าพีเอช (pH) ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (°Brix) ค่าปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติก ค่าสี และปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ โดยมีวิธีการทดสอบดังต่อไปนี้

การวัดค่าพีเอช ได้จากการนำตัวอย่างปริมาตร 20 มิลลิลิตร ไปวัดค่าพีเอช ด้วยเครื่อง pH Meter HANNA HI98103 แบบปากกา สอบเทียบที่ค่า pH 4.0 และ 7.0 อ่านค่าและบันทึกผลจำนวน 3 ซ้ำ

การวัดค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (Total Soluble Solid, TSS) วัดออกมาในหน่วยองศาบริกซ์ (°Brix) ด้วยเครื่อง Hand-Held Refractometer ATAGO N-1a อ่านค่าจากสเกลบริเวณรอยต่อของแถบทึบและแถบสว่าง และบันทึกผลจำนวน 3 ซ้ำ

การหาค่าปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดอะซิติก (Titratable Acidity: TA, g/L) ใช้การวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดอะซิติกด้วยวิธีการไทเทรต ปิเปตตัวอย่างชาปริมาตร 10 มิลลิลิตร ไทเทรตด้วยสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 0.1 M และใช้ฟีนอล์ฟทาลีน (Phenolphthalein) 1% เป็นอินดิเคเตอร์ จนสารละลายมีสีชมพู (End point) นำค่าปริมาณสารละลาย NaOH ที่ใช้ไปคำนวณหาค่าดังสมการที่ 1

$$TA\left(g/L\right) = \frac{N \; x V_1 \; x \; MW}{V_2} \qquad (1)$$

โดยที่ N = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน NaOH (mol/L)

V_1 = ปริมาตร (ml) ของสารละลายมาตรฐาน NaOH ที่ใช้ในการไทเทรต

MW = น้ำหนักโมเลกุลของกรดอะซิติก (g/mol) (ค่าเท่ากับ 60.05)

V_2 = ปริมาตรตัวอย่างน้ำชาหมักคอมบูชา (ml)

ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติกกับระยะเวลาการหมัก ถูกนำมาใช้เปรียบเทียบแล้วหาสมการทางคณิตศาสตร์ที่เหมาะสมในรูปเอกซ์โพเนนเชียล โดยนำผลการทดลองมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคสมการถดถอยแบบไม่เป็นเชิงเส้น (Nonlinear regression analysis) เพื่อหาสมการที่เหมาะสมโดยพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์แสดงการตัดสินใจ (Coefficient of determination, R^2) สูงที่สุด

การทดสอบค่าสี โดยนำตัวอย่างน้ำชาปริมาณ 20 มิลลิลิตร ทำการวัดค่าสีด้วยเครื่องวัดสี (Color meter) รุ่น HunterLab MiniScan XE Plus 45/0-s (ประเทศสหรัฐอเมริกา) โดยใช้หลักการอ่านค่าสีตามระบบ CIE (L^* a^* b^*) โดยรายงานค่าเป็น L^* (ค่าความสว่าง) โดยมีค่าตั้งแต่ 0 ถึง 100 *(+a*)* แสดงถึงค่าความเป็นสีแดง *(-a*)* แสดงถึงค่าความเป็นสีเขียว *(+b*)* แสดงถึงค่าสีเหลือง *(-b*)* แสดงถึงค่าสีน้ำเงิน (Suriwong *et al*., 2020)

การตรวจนับปริมาณยีสต์ โดยใช้เทคนิค Spread Plate บนอาหาร Yeast Extract Peptone Dextrose agar (YEPD agar) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจนับโคโลนี และรายงานเป็นค่า log CFU/ml

4. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ออกแบบการทดลองแบบ Full Factorial Design แสดงข้อมูลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (*mean±S.D.*) จากการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลด้วยวิธี Analysis of Variance (ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ค่าความแปรปรวนสมการถดถอยหรือค่าสัมประสิทธิ์แสดงการตัดสินใจ (Coefficient of determination, R^2) ใช้คำนวณเพื่อประเมินความถูกต้องของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ใช้ในการอธิบายการเปลี่ยนแปลงของค่าปริมาณกรดทั้งหมดในระหว่างกระบวนการหมักชาดำคอมบูชา

ผลการวิจัย

ผลการศึกษากระบวนการหมักชาดำคอมบูชา

เมื่อทำการหมักชาดำคอมบูชาพบว่า น้ำชาดำคอมบูชาจะมีความใสมากขึ้น มีตะกอนเพิ่มขึ้นเล็กน้อยบริเวณก้นขวด เมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น หัวเชื้อสกูบี้ที่มีลักษณะคล้ายวุ้นจะมีความหนาเพิ่มขึ้น เมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น แผ่นหัวเชื้อสกูบี้จะสร้างแผ่นวุ้นเพิ่มขึ้นบริเวณผิวหน้าจนเมื่อระยะเวลาสิ้นสุดการหมัก แผ่นหัวเชื้อสกูบี้เดิมจะหลุดออกจากแผ่นวุ้นหัวเชื้อสกูบี้ที่สร้างขึ้นใหม่ (Figure 3)

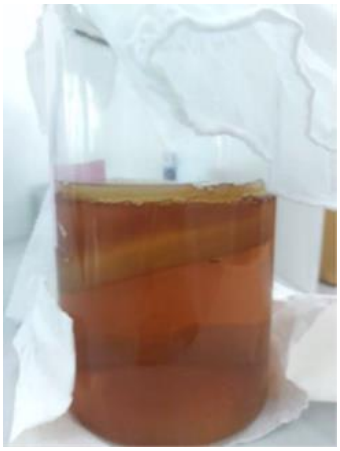

Figure 3 1 L of black tea kombucha

การเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชและปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติกที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักของชาดำ (Figure 4) พบว่า การลดลงของค่าพีเอชและการเพิ่มขึ้นของความเป็นกรด มีจุดเปลี่ยนที่เห็นได้ชัดในช่วง 9 วันแรกของการหมัก โดยในวันแรกค่าพีเอชเริ่มต้นของการหมักเท่ากับ 3.70±0.057 และเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงลดลงและเพิ่มขึ้นอย่างไม่คงที่ในช่วง 6 วันแรกของการหมัก เพราะในช่วงแรกยีสต์จะทำหน้าที่ในการเปลี่ยนน้ำตาลทำให้เกิดการผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) และเอทานอลขึ้น เหตุนี้จึงทำให้ค่าพีเอชลดลง ปรากฏการณ์ต่อมาแบคทีเรียจะทำหน้าที่เปลี่ยนเอทานอลไปเป็นกรด ทำให้ค่าพีเอชเพิ่มสูงขึ้น แต่เมื่อเกิดกระบวนการหมักไปเรื่อย ๆ ค่าพีเอชกลับลดลงอย่างต่อเนื่องแบบขั้นบันได และลดลงไปถึงค่าต่ำกว่า 3.50 ในวันที่ 11 โดยมีค่าเท่ากับ 3.30±0.303 จนกระทั่งในวันที่สิ้นสุดการหมักชาคอมบูชา พบว่า ค่าพีเอชมีค่าเท่ากับ 3.10±0.159 ในขณะที่เมื่อพิจารณาจากปริมาณกรดทั้งหมด พบว่า ในช่วง 6 วันแรกของการหมัก ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติกจะมีการลดลงและเพิ่มขึ้นจากค่าเริ่มต้น ที่มีค่าเท่ากับ 1.94±0.029 g/L จนกระทั่งวันที่ 7 ของการหมักที่แบคทีเรียมีการเปลี่ยนเอทานอลเพื่อสร้างกรด ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติกจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นจาก 1.25±0.018 g/L (วันที่ 6) จนมีค่าถึงค่ามาตรฐานเท่ากับ 4 g/L ซึ่งเป็นค่ามีรสชาติที่ดี *(Cvetkovic et al*., 2008) ในวันที่ 11 คือ มีค่าเท่ากับ 4.25±0.110 g/L จนกระทั่งในวันที่สิ้นสุดการหมัก พบว่า มีปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติกมากถึง 8.55±0.250 g/L นอกจากนี้พิจารณาจากปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (Total Soluble Solid, TSS) หรือความหวาน

ที่เกิดขึ้นในชาดำหมักคอมบูชา จะมีลักษณะการเปลี่ยนแปลงแบบไม่คงที่ โดยในวันที่ 1 มีค่า TSS เท่ากับ 8.30±0.050°Brix และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในช่วงแรก จนถึงวันที่ 6 ของการหมัก ค่า TSS จะเริ่มคงที่และเริ่ม ลดลงในวันที่ 12 จนกระทั่งมีค่า TSS สุดท้ายในวันสิ้นสุดการหมักเท่ากับ 9.00±0.037°Brix

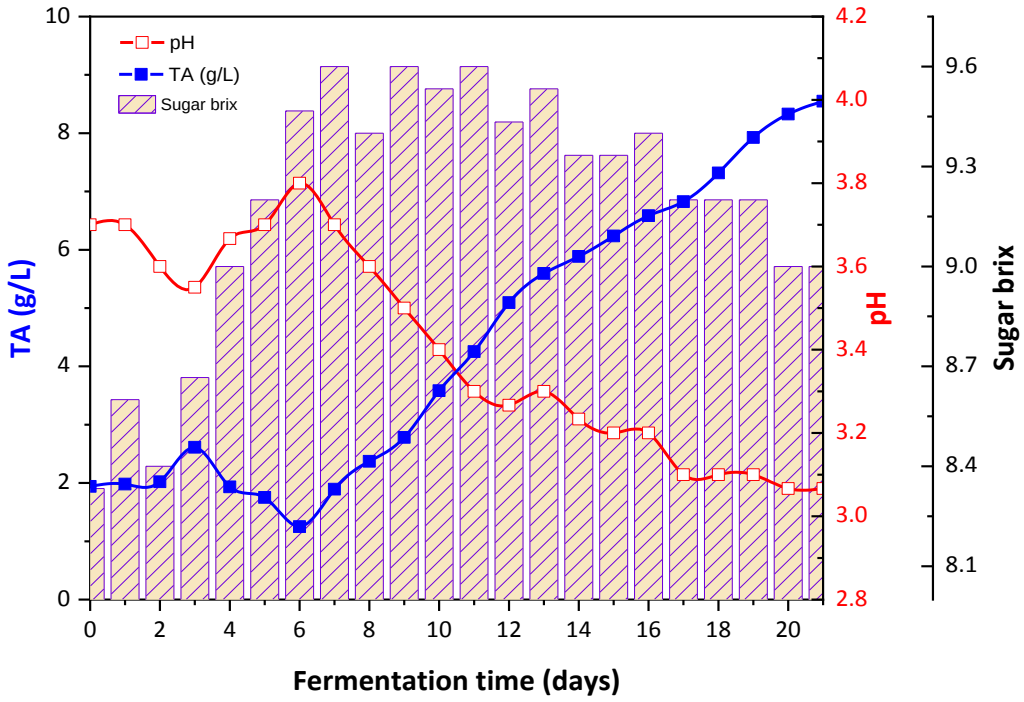

Figure 4 Titratable Acidity (TA, g/L), pH value and Total Soluble Solid (TSS, °Brix) During fermentation of black tea kombucha, at room temperature (25-28°C)

ผลการใช้คลื่นอัลตร้าโซนิคต่อจลพลศาสตร์ของปริมาณกรดทั้งหมด และระยะเวลาการหมัก

จากการแบ่งตัวอย่างการทดลองเป็น 2 ชุดการทดลอง คือ ชาดำคอมบูชาที่หมักในสภาวะปกติ (ชุดควบคุม) และชาดำคอมบูชาที่หมักด้วยการใช้คลื่นอัลตร้าโซนิค ดังแสดง Figure 5

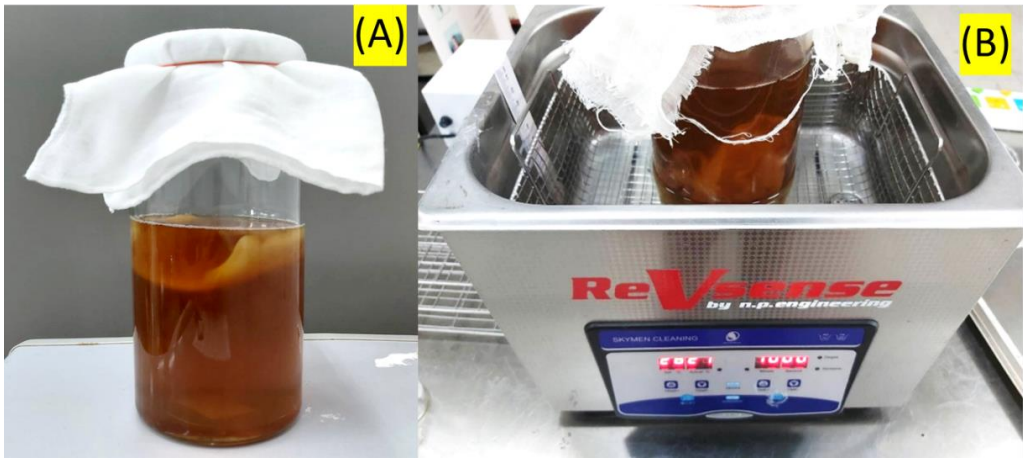

Figure 5 fermentation of black tea kombucha without ultrasonic (Control) (A)
Ultrasonic treatment with fermentation of black tea kombucha (40 kHz) (B)

จากผลการทดลองหมักชาดำคอมบูชาที่สภาวะปกติ จะได้รสชาติและปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดอะซิติกได้ถึงค่าที่กำหนด (4.00 g/L) ที่ระยะเวลาการหมักที่ 11 วัน ในการทดลองเพื่อศึกษาผลของการใช้คลื่นอัลตร้าโซนิค จึงศึกษาลักษณะการหมักชาดำคอมบูชาที่ระยะเวลาทั้งสิ้น 14 วันหรือ 2 สัปดาห์ จาก Figure 6 พบว่า ลักษณะของปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดอะซิติกที่ผลิตขึ้นในระหว่างการหมักจะมีค่าไปในทิศทางเดียวกัน คือ จะมีอัตราการผลิตกรดในช่วง 6 วันแรกเป็นไปอย่างช้าและคงที่ แต่จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วตั้งแต่วันที่ 7 เป็นต้นไป ดังนั้น จึงเลือกใช้ภาพของฟังก์ชันเอ็กซ์โพเนนเชียลเป็นตัวแบบเชิงคณิตศาสตร์ในรูปสมการ $A = A_0 e^{-kt}$ โดยพิจารณาจากค่า R^2 ที่มีค่าอยู่ในช่วง 0.96 – 0.99 (Table 2) ซึ่งใกล้เคียงกับ 1 แสดงให้เห็นว่า ตัวแบบเชิงคณิตศาสตร์ที่นำมาใช้นั้นสามารถอธิบายความผันแปรของค่าตัวแปรตอบสนองที่กระจายรอบค่าเฉลี่ยได้เป็นอย่างดีหรือใช้อธิบายลักษณะการเพิ่มขึ้นแบบคงตัวของปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดอะซิติกในระหว่างกระบวนการหมักชาดำคอมบูชาได้เป็นอย่างดี แสดงดัง Figure 6 และ Table 2

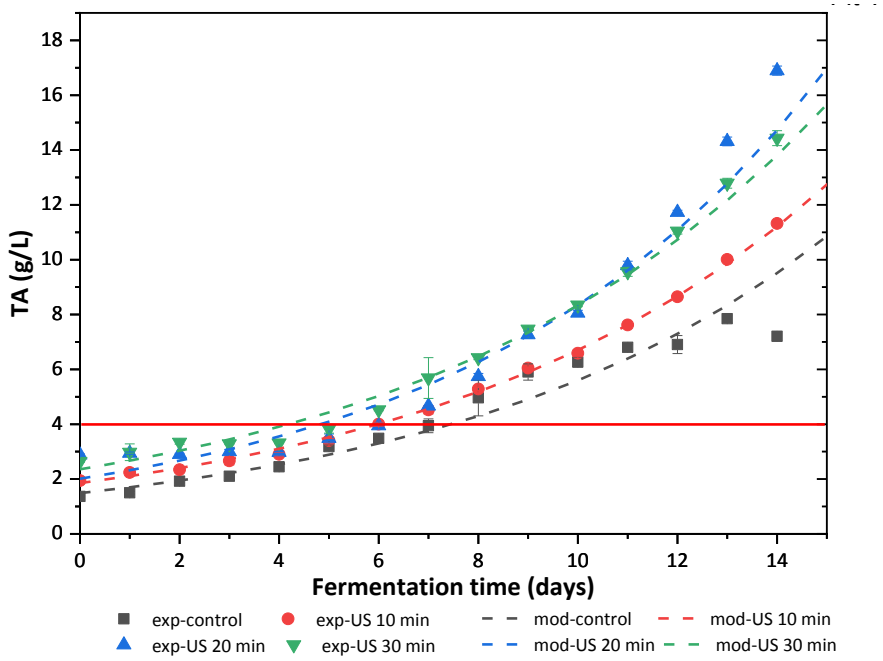

Figure 6 Evoluation of TA (g/L) during 14-day fermentation period of black tea kombucha (Exponential equation) comparing between with and without ultrasonic treament

จาก Figure 6 จะเห็นได้ว่า ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดอะซิติก (TA) ที่ผลิตขึ้นมีการเพิ่มขึ้นมีค่าผันแปรตามเวลาอย่างต่อเนื่องและรวดเร็ว เมื่อทำการทรีทด้วยคลื่นอัลตร้าโซนิคแบบ US pulse-US pause เป็นเวลา 10, 20 และ 30 นาทีต่อวัน โดยปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดอะซิติกเพิ่มขึ้นถึงระดับมาตรฐานที่อ้างอิงว่ามีรสชาติที่ดี (4.00 g/L) (Cvetkovic *et al*., 2008) ในวันที่ 5 เมื่อทรีทด้วยคลื่นอัลตร้าโซนิคแบบ US pulse-US pause ที่เวลา 30 นาทีต่อวัน โดยมีปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดอะซิติกมากที่สุด (4.52±0.035 g/L) เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่มีปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดอะซิติกเกิดขึ้นเพียง 3.48±0.140 g/L นอกจากนี้ การหมักชาคอมบูชาที่ทรีทด้วยคลื่นอัลตร้าโซนิคแบบ US pulse-US pause เป็นเวลา 10 และ 20 นาทีต่อวัน ให้ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดอะซิติกสูงถึงค่ามาตรฐานอ้างอิงในการหมักวันที่ 6 เท่ากับ 4.52±0.144 และ 4.66±0.018 g/L ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับการหมักสภาวะปกติที่ต้องใช้เวลาในการหมักถึง 8 วัน เพื่อให้ได้ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดอะซิติกเท่ากับ 4.69±0.661 g/L ซึ่งใช้เวลาในการหมักสั้นลงเมื่อเทียบกับการหมักสภาวะปกติประมาณ 2-3 วัน โดยคิดเป็นร้อยละ 25 และ 60 ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบจากค่า k ที่บ่งบอกถึงอัตราการเกิดปฏิกิริยา พบว่า ตัวอย่างที่ผ่านการทรีทด้วยคลื่นอัลตร้าโซนิคเป็นเวลา 30 นาทีต่อวัน สามารถลดระยะเวลาการหมักชาดำคอมบูชาได้สั้นที่สุด คิดเป็นร้อยละ 58.31 เมื่อเทียบกับการหมักในสภาวะปกติ (Table 2)

จาก Table 2 ผลการศึกษาพบว่า ลักษณะการเปลี่ยนแปลงค่าปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดอะซิติก (TA) ที่ผลิตได้ในระหว่างกระบวนการหมักชาดำคอมบูชาทั้งแบบสภาวะควบคุมและสภาวะที่ทรีทด้วยคลื่นอัลตราโซนิค มีลักษณะ

เป็นเอกซ์โพเนนเชียลอยู่ในรูป $A = A_o e^{-kt}$ ที่ค่า R^2 เท่ากับ 0.96 – 0.99 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงเท่ากับ 1.0 แสดงให้เห็นว่าตัวแบบคณิตศาสตร์ที่ได้มานั้นสามารถใช้อธิบายความผันแปรของค่าตัวแปรตอบสนองที่กระจายรอบค่าเฉลี่ยได้เป็นอย่างดี จากสมการจะได้ว่า ค่า A_0 และค่า k เป็นค่าคงที่ หรือเรียกได้ว่า เป็นค่าคงที่อัตรา (Rate constant) ซึ่งเป็นค่าคงที่เฉพาะปฏิกิริยาหนึ่ง ๆ หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า Specific rate constant หากค่า k มาก จะแสดงถึงอัตราการเกิดปฏิกิริยาที่เร็ว เช่นเดียวกับในการทดลองนี้ที่ให้ค่าปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดอะซิติกที่เกิดขึ้นเพิ่มขึ้นผันแปรตามระยะเวลา (t) เมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดอะซิติกจะมีค่าเพิ่มขึ้นจากค่าเริ่มต้นทุกสภาวะการทดลอง เช่นเดียวกับผลการวิจัยของ Torán-Pereg *et al.* (2021) โดยในขั้นตอนเริ่มต้นของการหมักจะเห็นได้ว่าค่าความเข้มข้นของกรดต่ำ หลังจากนั้นยีสต์จะทำการไฮโดรไลซ์ซูโครสเป็นกลูโคสและฟรุกโตส แบคทีเรียจึงสามารถนำสารเหล่านี้เป็นแหล่งสารอาหารในการผลิตกรดอินทรีย์เช่นกรดอะซิติก ทำให้ความเป็นกรดเพิ่มขึ้น จึงทำให้สอดคล้องกับผลลัพธ์ที่ได้ เนื่องจากการเติบโตอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อทำการทรีทด้วยคลื่นอัลตร้าโซนิค จะเป็นการกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาการทำงานของยีสต์และแบคทีเรียเพิ่มขึ้น โดยสังเกตได้จากตั้งแต่วันที่ 6 ถึงวันที่ 14 ด้วยเหตุผลดังกล่าวที่พบว่า ที่สภาวะการทรีทด้วยคลื่นอัลตร้าโซนิคเป็นช่วงต่อเนื่องนาน 30 นาทีต่อวัน มีอัตราการเกิดปฏิกิริยาสูงที่สุดหรือทำให้ค่ากรดเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วมากที่สุด

Table 2 Mathematical equation of evaluation of TA (g/L) and R^2 during fermentation of black tea kombucha in each treatment

Treatment	Equation	R-Squared	Suitable fermentation time (day)	Reduction of fermentation time comparing with control (%)	Increasing of TA (g/L) comparing with control (%)
Control	$A = 1.4898e^{0.1324t}$	0.96	8	-	-
US10 min	$A = 1.8557e^{0.1284t}$	0.99	6	25%	24.56%
US 20 min	$A = 2.0106e^{0.1422t}$	0.96	6	25%	34.96%
US 30 min	$A = 2.3585e^{0.1262t}$	0.98	5	60%	58.31%

เช่นเดียวกับการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชเปรียบเทียบระหว่างสภาวะควบคุมและสภาวะที่ทรีทด้วยคลื่นอัลตร้าโซนิค (Figure 7) พบว่า การเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักของชาดำโดยการใช้คลื่นอัลตร้าโซนิคที่ระยะเวลาต่าง ๆ ค่าพีเอชมีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่องในช่วงแรกของการหมัก (เริ่มต้นมีค่าเท่ากับ 3.10 – 3.13) และจะลดลงต่ำสุดจนถึงค่าในช่วงเท่ากับ 2.50 – 2.60 โดยคล้ายกับงานวิจัยของ Ahmed *et al.* (2020) ได้รายงานว่า เมื่อการหมักดำเนินไปถึงช่วง 2.95 ถึง 2.50 เมื่อสิ้นสุดการหมัก ค่าพีเอชบอกได้ว่ามีซูโครสซึ่งเผาผลาญเป็นกรดอินทรีย์โดยแบคทีเรียและยีสต์นำไปสู่การเพิ่มความเป็นกรดของเครื่องดื่ม ระดับพีเอชจะลดลงตามการเพิ่มขึ้นของปริมาณกรดอินทรีย์ทั้งหมดในระหว่าง

การหมัก แต่รสชาติของชาดำคอมบูชาที่ให้การยอมรับหรือเป็นเกณฑ์มาตรฐานคือ ปริมาณกรดทั้งหมดควรมีค่าเท่ากับ 4.00 g/L (Cvetkovic *et al*., 2008) (Figure 7 เส้นประสีแดง) การใช้ระยะเวลาการหมักที่สั้นที่สุดจึงเกิดขึ้นในสภาวะที่ใช้คลื่นอัลตร้าโซนิคกระตุ้นในระหว่างกระบวนการหมักเป็นเวลา 30 นาทีต่อวัน (Figure 7(D)) โดยใช้ระยะเวลาเพียง 5 วันเป็นการสิ้นสุดการหมักชาดำคอมบูชาที่ได้ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดอะซิติกและพีเอชเป็นไปตามที่ต้องการ ซึ่งสามารถลดระยะเวลาการหมักลงได้ถึงร้อยละ 58.31

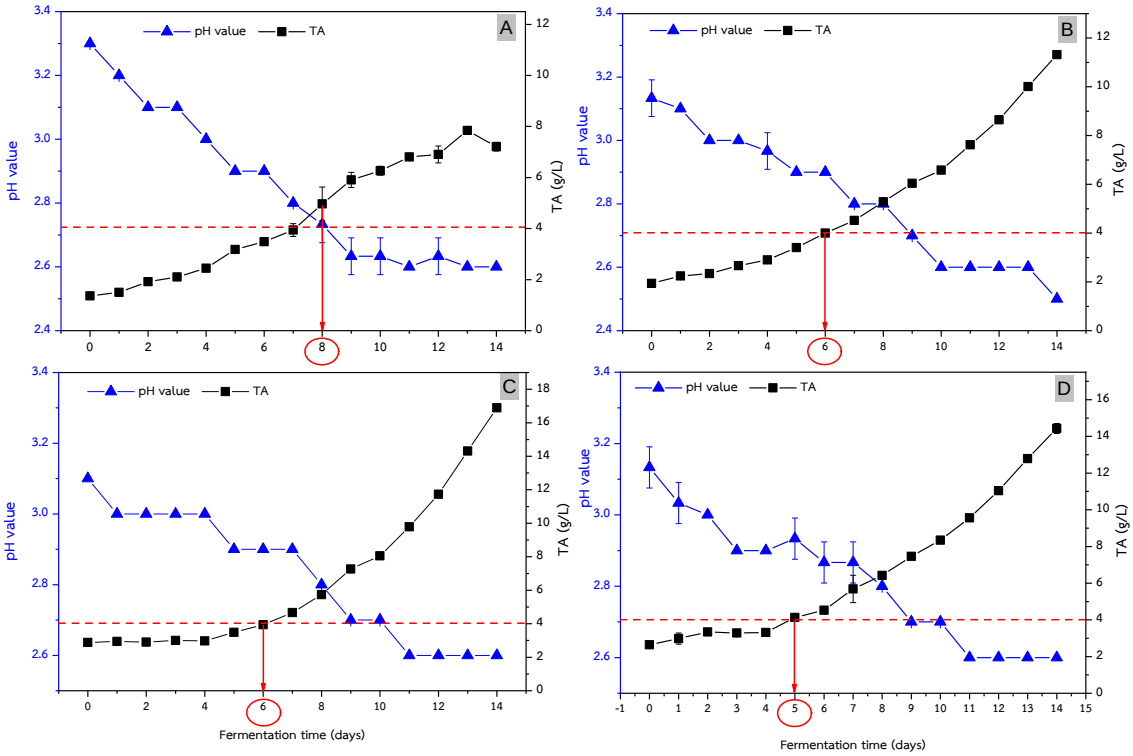

Figure 7 Evaluation of pH value and Titratable Acidity (TA) during fermentation of black tea kombucha comparing in each treatment at 14-day period
(A) Control (B) US 10 min (C) US 20 min (D) US 30 min

ผลการใช้คลื่นอัลตร้าโซนิคต่อคุณภาพทางกายภาพ และทางเคมีของชาดำคอมบูชา

ในการหมักชาดำคอมบูชาที่ไม่ได้ใช้คลื่นอัลตร้าโซนิค พบว่า ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (TSS) หรือค่าความหวานของชาคอมบูชามีค่าค่อนข้างคงที่ เริ่มต้นเท่ากับ 9.60±0.115°Brix (Figure 8) และมีการเพิ่มขึ้นและลดลงในช่วงวันที่ 4 จนถึงวันที่ 9 (มีค่าในช่วง 9.10 – 9.80°Brix) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า มีการเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสโดยจุลินทรีย์ นอกจากนี้ ค่า TSS

ที่เปลี่ยนแปลงนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Malbaša *et al*. (2008) ซึ่งได้รายงานว่า มีการเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสโดยจุลินทรีย์อย่างชัดเจนโดยเฉพาะตั้งแต่วันที่ 3 ถึงวันที่ 10 ของกระบวนการหมัก จากนั้นจะเริ่มช้าลงและเพิ่มขึ้นอีก อาจเกิดจากการผลิตสารประกอบอื่น ๆ จนกระทั่งสิ้นสุดการหมักพบว่า ชาคอมบูชาที่ผลิตจากชาดำ มีค่า TSS เท่ากับ 9.20±0.025°Brix แต่ทั้งนี้พบว่า แนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของค่า TSS เมื่อใช้คลื่นอัลตร้าโซนิคในระหว่างกระบวนการหมักชานั้น มีแนวโน้มที่ลดลงแตกต่างจากสภาวะควบคุม โดยจากค่าเริ่มต้นเท่ากับ 9.60±0.000°Brix และลดลงเรื่อย ๆ เมื่อเวลาการหมักเพิ่มขึ้น จนสิ้นสุดการหมักในวันที่ 14 พบว่า ค่า TSS สุดท้ายของชาดำคอมบูชาที่ใช้คลื่นอัลตร้าโซนิคที่เวลา 10, 20 และ 30 นาทีต่อวัน มีค่าเท่ากับ 8.20±0.096, 7.46±0.026 และ 7.80±0.018°Brix ตามลำดับ จึงสามารถอธิบายได้ว่า เมื่อมีการใช้คลื่นอัลตร้าโซนิคไปกระตุ้นในระหว่างกระบวนการหมักชาคอมบูชานั้น การสั่นจะช่วยเร่งปฏิกิริยาการใช้ซูโครสได้เพิ่มขึ้นจนทำให้ค่า TSS ลดลงอย่างรวดเร็วและเหลือปริมาณน้ำตาลน้อยลงเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะการหมักปกติ (Huezo *et al*., 2019)

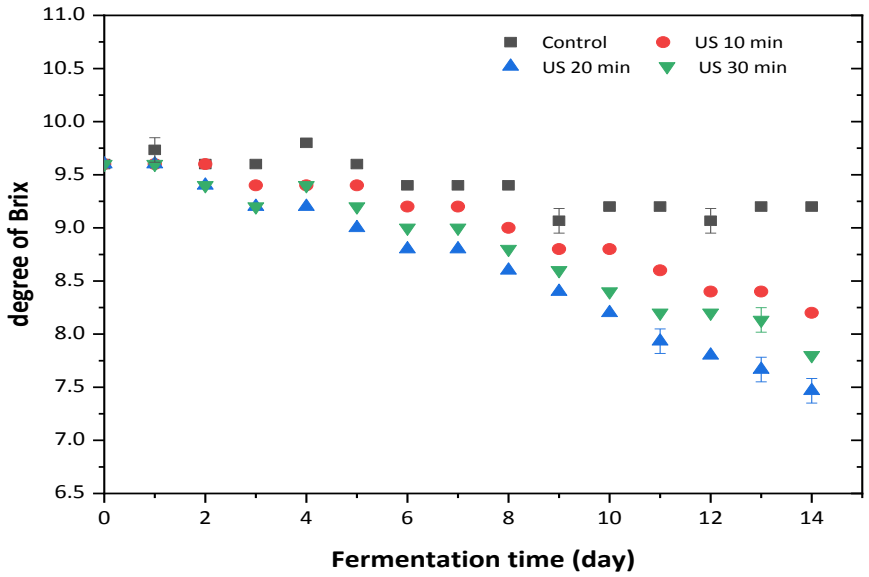

Figure 8 Evaluation of Total Soluble Solid (TSS, °Brix) during 14-day fermentation period of black tea kombucha comparing in different treatment

Table 3 Average value of brightness (*L**) in CIE (*L*-a*-b**) at day 0 and day 14 during kombucha fermentation

CIE (*L*-a*-b**)	*L**		*a**		*b**	
	0 Days	14 Days	0 Days	14 Days	0 Days	14 Days
Control	2.60±0.812^{b}	1.75±0.040^{a}	0.08±0.227^{ab}	0.02±0.394^{ab}	1.12±0.367^{bc}	-0.28±0.909^{a}
US 10 min	2.46±0.199^{b}	3.26±0.265^{c}	0.003±0.300^{ab}	0.17±0.258^{b}	0.94±0.345^{bc}	0.20±0.459^{ab}
US 20 min	2.28±0.227^{ab}	3.84±0.131^{d}	-0.11±0.109^{ab}	-0.55±0.300^{a}	1.16±0.492^{bc}	1.38±0.797^{c}
US 30 min	2.43±0.127^{b}	4.93±0.044^{e}	-0.42±0.272^{ab}	-0.22±0.587^{ab}	1.24±0.471^{bc}	0.22±0.263^{ab}

[1)]Values are mean ± SD; n=3 and different superscript within a column significantly different ($p<0.05$)

จาก Table 3 พบว่า ค่าความสว่าง *(L*)* ของน้ำชาหมักคอมบูชาในทุกสภาวะ ณ วันที่ 0 และ 14 นั้นมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สีของน้ำชาเมื่อใช้คลื่นอัลตร้าโซนิคมีสีที่สว่างมากขึ้นเมื่อเทียบกับก่อนการเริ่มการหมักชา (วันที่ 0) ในทุกสภาวะ โดยในวันเริ่มต้นของการหมัก ค่า *L** มีค่าอยู่ในช่วงเท่ากับ 2.28±0.227 ถึง 2.46±0.199 และมีค่าเพิ่มขึ้นในทุกสภาวะการใช้คลื่นอัลตร้าโซนิคที่เวลา 10, 20 และ 30 นาทีต่อวัน เท่ากับ 3.26, 3.84 และ 4.93 ตามลำดับ ในขณะที่การหมักชาดำคอมบูชาในสภาวะปกติมีค่าความสว่างลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับวันที่เริ่มการหมัก โดยมีค่า *L** ลดลงจาก 2.60±0.812 เหลือเท่ากับ 1.75±0.040 เหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากการทรีทด้วยคลื่นอัลตร้าโซนิคทำให้เกิดการสั่นซึ่งการสั่นของคลื่นอัลตร้าโซนิคจะทำให้ของเหลวขยายตัวและหดตัวอย่างต่อเนื่อง เมื่อของเหลวขยายตัวเกินความต้านทานแรงดึงฟองจะเกิดขึ้นซึ่งในที่สุดก็ระเบิดในกระบวนการคาวิเตชั่น (Cavitation) และสร้างกระบวนการทางกายภาพและทางเคมีที่หลากหลาย (Bartkiene *et al.*, 2018) เมื่อสังเกตจากลักษณะทางกายภาพพบว่า น้ำชาที่ทรีทด้วยคลื่นอัลตร้าโซนิคจะมีตะกอนของเนื้อชาเกิดขึ้นบริเวณก้นขวดมากกว่าตัวอย่างควบคุม ทำให้ค่าความสว่างของสีน้ำชาที่วัดได้มีค่าเพิ่มขึ้น(Figure 9)

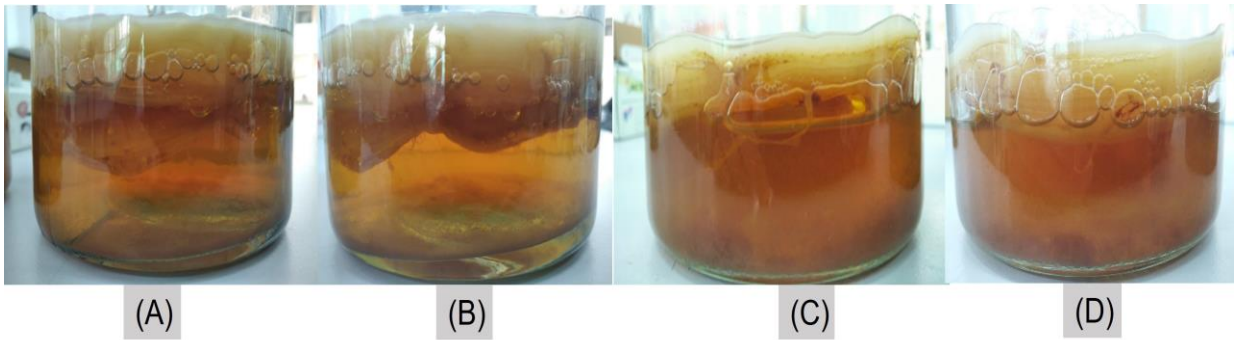

Figure 9 The color of black tea kombucha in (A) Control (B) US 10 min (C) US 20 min (D) US 30 min

ปริมาณยีสต์เริ่มต้นที่พบในน้ำชาดำคอมบูชาที่สภาวะปกติมีค่าเท่ากับ 2.8x10^4 CFU/ml เมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น พบว่า ปริมาณยีสต์เพิ่มขึ้นจนถึงวันที่ปริมาณกรดถึง 4.00 g/L พบว่า มีปริมาณยีสต์มากถึง 53.0x10^4 CFU/ml เช่นเดียวกับปริมาณยีสต์ที่ตรวจพบในน้ำชาดำคอมบูชาที่ทรีทด้วยคลื่นอัลตร้าโซนิคมีการเพิ่มขึ้นในวันที่ปริมาณกรดถึงมาตรฐานมากถึง 40.3x10^4 CFU/ml แต่สาเหตุที่ปริมาณยีสต์มีค่าต่ำกว่าที่พบในสภาวะปกติ เนื่องจากปริมาณยีสต์เริ่มต้นของการหมักด้วยคลื่นอัลตร้าโซนิคมีค่าน้อยกว่า (1.7x10^4 CFU/ml) การเพิ่มขึ้นของปริมาณยีสต์ในระหว่างการหมักชาดำคอมบูชานั้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Pitt and Ross (2003) ที่รายงานว่า การใช้คลื่นอัลตร้าโซนิคจะช่วยเพิ่มอัตราการขนส่งออกซิเจนและสารอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์จุลินทรีย์และเพิ่มอัตราการขนส่งของเสียออกจากเซลล์ ซึ่งช่วยให้อัตราการเติบโตของจุลินทรีย์เร็วขึ้น หรือมีการเจริญเติบโตของยีสต์เพิ่มขึ้นจากวันแรกจนถึงวันที่ปริมาณกรดถึง 4.00 g/L (Figure 10)

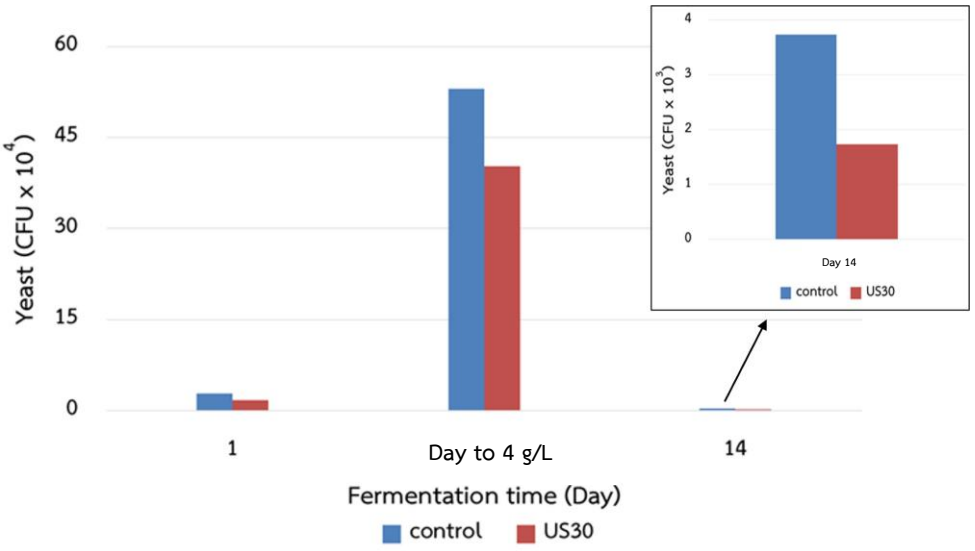

Figure 10 Evaluation of *Yeast* (CFUx10^4) during 14-day fermentation period of black tea kombucha Comparing control condition and US pulse-US pause (30 min per day)

อย่างไรก็ตาม ปริมาณยีสต์ลดลงเมื่อการหมักสิ้นสุด อาจเนื่องมาจากในชานั้นมีโปรไบโอติกส์ แบคทีเรียและยีสต์ที่เฉพาะเจาะจงในคอมบูชา เมื่อแต่ละส่วนเกิดปฏิกิริยากันขึ้นจึงเกิดเป็นฟองและรสชาติในชาคอมบูชา (Jayabalan *et al.*, 2010) รวมถึงยังมีกล่าวอีกว่า หากในกระบวนการใดที่มีการใช้คลื่นอัลตร้าโซนิคในระดับที่สูงขึ้น อาจส่งผลให้เกิดการรั่วไหลของสารภายในเซลล์ เนื่องจากการหยุดชะงักของเซลล์หรือการสลับกันของ lipid bilayer ของเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เกิด lipid peroxidation และนำไปสู่การตายของเซลล์ในที่สุด จึงเป็นผลให้จำนวนยีสต์ในน้ำหมักที่ได้รับคลื่นอัลตร้าโซนิคมีปริมาณน้อยกว่าตัวอย่างที่ไม่ผ่านการทรีทด้วยคลื่นอัลตร้าโซนิค นอกจากนี้ May *et al.* (2019) รายงานถึงกระบวนการหมักชาคอมบูชาที่ใช้หัวเชื้อสกูบี้และน้ำตาลเป็นสารตั้งต้นในการหมักชา ว่า การที่ยีสต์และแบคทีเรียทำปฏิกิริยากันทำให้เกิดเอทานอลและ

กรดอะซิติก ส่งผลทำให้ยีสต์และแบคทีเรียบางชนิดไม่สามารถทนอยู่ได้ เช่นเดียวกับการที่น้ำชาหมักมีความเป็นกรดสูง ค่าพีเอชต่ำ ก็อาจส่งผลต่อจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในน้ำชาหมักคอมบูชาได้เช่นกัน

วิจารณ์ผลการวิจัย

ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติกและค่าพีเอชเป็นตัวแปรทางสิ่งแวดล้อมที่สำคัญที่สุดอย่างหนึ่งที่มีผลต่อการหมักของคอมบูชาจึงส่งผลต่อกิจกรรมทางชีวภาพของเครื่องดื่มชาที่เกิดขึ้น นอกจากนี้ยังเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารประกอบเคมีซึ่งอาจส่งผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Soto *et al*., 2018) ในกระบวนการหมักชาคอมบูชาเป็นกระบวนการหมักแบบ 2 ขั้นตอน คือ การเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอล และการเปลี่ยนเอทานอลเป็นกรดน้ำส้มหรือกรดอะซิติก ดังแสดงในสมการที่ 2 และ 3

$$C_6H_{12}O_8\,(Glucose) \xrightarrow{Yeast\ in\ Scoby} 2C_2H_5OH\,(Ethyl\ Alcohol) + 2CO_2 + Energy \qquad (2)$$

$$C_2H_5OH\,(Ethyl\ Alcohol) + O_2 \xrightarrow[\text{ใน Scoby}]{\text{Bacteria}} CH_3COOH\,(Acetic\ acid) + H_2O + Energy \qquad (3)$$

จากปรากฏการณ์การย่อยน้ำตาลให้ได้เอทานอล และเปลี่ยนรูปเป็นกรดอะซิติกนั้น สามารถใช้อธิบายกับปรากฏการณ์การเกิดกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติก ค่าพีเอช และปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดในกระบวนการหมักชาดำคอมบูชาได้ นอกจากนี้จากผลการทดลองที่ให้ลักษณะการลดลงของค่าพีเอชและเพิ่มขึ้นของปริมาณกรดเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้นเป็นไปตามลักษณะการหมักชาในงานวิจัยของ Cvetkovic *et al*. (2008) โดยในช่วง 4 วันแรกของการหมักค่าพีเอชจะลดลง ซึ่งเป็นผลจากการสังเคราะห์กรดอะซิติกขั้นเริ่มต้น หลังจากนั้นจะมีการสร้างกรดเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง จึงส่งผลให้ค่าพีเอชลดลงอย่างเห็นได้ชัดในช่วงที่เกิดการหมักในปริมาณที่มากพอแล้ว โดยการลดลงของค่าพีเอชนี้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Jayabalan *et al*. (2007) ที่รายงานว่า ค่าพีเอชจะลดลงจาก 5.00 ถึง 3.00 ในช่วง 12 วันแรกของการหมักไม่ว่าจะเป็นการหมักชาคอมบูชาจากชาเขียว ชาดำ และกากชา อย่างไรก็ตามค่าพีเอชต่ำสุดที่ยอมรับได้ควรอยู่ในช่วง 2.50 – 3.50 (Soto *et al*., 2018) รวมถึงเพื่อให้ได้เครื่องดื่มรสเปรี้ยวและมีความกลมกล่อม การหมักควรสิ้นสุดลงเมื่อความเป็นกรดทั้งหมดถึงค่าที่เหมาะสม 4.00 g / L (Cvetkovic *et al*., 2008) จากการศึกษางานวิจัยครั้งนี้ที่ทำการหมักชาคอมบูชาจากชาดำในปริมาณทดสอบ 1 ลิตรในโถแก้วใช้ปริมาณชาดำ 3 กรัมต่อลิตร และปริมาณน้ำตาล 10% (w/v) แล้วจึงเริ่มการหมักจากการเติมหัวเชื้อ SCOBY 10% (v/v) ที่สภาวะอุณหภูมิห้อง จะใช้ระยะเวลาการหมักถึง 8-11 วัน กว่าที่ปริมาณกรดจะสูงถึง 4.00 g/L ในขณะที่เมื่อทำการทรีทด้วยคลื่นอัลตร้าโซนิคแบบสั่นหยุดหรือ Pulse-Pause เป็นเวลา 10, 20 และ 30 นาทีต่อวัน สามารถลดระยะเวลาการหมักเพื่อให้ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดอะซิติกถึงระดับมาตรฐานได้ภายใน 5 – 6 วัน เหตุที่เป็นเช่นนี้เกิดจากการที่คลื่นอัลตร้าโซนิคได้สร้างแรงดันสูงและต่ำสลับกันทำให้เกิดการบีบอัด ความดันที่ลดลงอย่างกะทันหันจะทำให้เกิดโพรงสุญญากาศตามมาด้วยการกลับสู่ความดันเดิมอย่างรวดเร็ว ซึ่งทำให้โพรงยุบตัว เป็นการปล่อยพลังงานซึ่งจะถูกถ่ายโอนไปยังตัวกลาง สิ่งนี้ช่วยกระตุ้นการถ่ายเทมวลสาร จึงเป็นการเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ สอดคล้องกับงานวิจัยของ

Ahmed *et al.* (2020) ที่รายงานว่า เมื่อการหมักดำเนินไปถึงช่วงของค่าพีเอช 2.95 ถึง 2.50 เมื่อสิ้นสุดการหมัก ค่าพีเอชที่เป็นตัวบ่งบอกว่ามีซูโครสซึ่งเผาผลาญเป็นกรดอินทรีย์โดยแบคทีเรียและยีสต์นำไปสู่การเพิ่มความเป็นกรดของเครื่องดื่ม ระดับพีเอชจะลดลงตามการเพิ่มขึ้นของปริมาณกรดอินทรีย์ทั้งหมดในระหว่างการหมัก ส่วนปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติกมีค่าเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาในการหมัก โดยมีค่าเริ่มเริ่มต้นเท่ากับ 1.94 g/L จนกระทั่งค่าปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดอะซิติกมีค่าเพิ่มขึ้นเท่ากับ 11.32 g/L ในวันที่ 14 เป็นอันสิ้นสุดการหมัก

นอกจากนี้ ทางผู้วิจัยจึงนำผลการทดลองไปเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Huezo, L. *et al.* (2019) ที่ได้ทำการทดลองหมักสารละลายน้ำข้าวโพดด้วยน้ำตาลและทำการทรีทด้วยคลื่นอัลตร้าโซนิคแบบทางตรงและทางอ้อมในระหว่างกระบวนการหมัก พบว่า การทรีทด้วยคลื่นอัลตราโซนิคทั้งแบบทางตรงและทางอ้อม มีผลทำให้ยีสต์ผลิตเอทานอลน้อยกว่าตัวอย่างที่ไม่ให้อัลตร้าโซนิค รวมถึงในงานวิจัยของ (Al Daccache *et al.,* 2020) ที่ได้ใช้คลื่นอัลตร้าโซนิคแบบ US pulse-US pause พบว่า ปริมาณยีสต์และผลผลิตไบโอแมสมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ช่วยลดปริมาณเอทานอลในระหว่างกระบวนการหมักลงถึง 10 เท่า จัดว่าการใช้คลื่นอัลตร้าโซนิคช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการหมักไซเดอร์จากผลแอปเปิ้ลได้เป็นอย่างดี

จากผลการศึกษาสามารถนำสมการทางคณิตศาสตร์ในรูป $A = A_0 e^{-kt}$ มาใช้อธิบายลักษณะการเกิดกรดทั้งหมดในรูปของกรดอะซิติกที่เกิดขึ้นผันแปรตามเวลา (t) ในระหว่างกระบวนการหมักชาดำคอมบูชาได้ทั้งสภาวะการหมักปกติและการหมักที่ใช้คลื่นอัลตร้าโซนิคได้เป็นอย่างดีและมีความเหมาะสม โดยพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์แสดงการตัดสินใจหรือ Coefficient of determination, (R^2) ที่มีค่าสูงและใกล้เคียงกับค่า 1 โดยเมื่อกระตุ้นด้วยคลื่นอัลตร้าโซนิคในการหมักชาดำคอมบูชา จะช่วยให้ยีสต์และแบคทีเรียทำปฏิกิริยากับหัวเชื้อสกูบี้และน้ำตาลที่ใช้ในการหมักได้ดียิ่งขึ้น ส่งผลให้ปริมาณกรดเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ทำให้สามารถใช้ระยะเวลาในการหมักชาดำคอมบูชาได้สั้นลง เช่นเดียวกับผลการวิจัยของ Torán-Pereg *et al.* (2021) ทั้งนี้การเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบทางเคมีอาจเกิดจากปัจจัยภายนอก เช่น สภาพทางภูมิศาสตร์ ภูมิอากาศ รวมทั้งขึ้นอยู่กับชนิดของยีสต์ และแบคทีเรียที่มีอยู่ในหัวเชื้อ (Chakravorty *et al*., 2016) เช่น สภาพอากาศที่เกิดขึ้นขณะทำการหมักชาคอมบูชา หัวเชื้อมาจากแหล่งที่แตกต่างกัน เป็นต้น สิ่งเหล่านี้ล้วนเป็นปัจจัยอย่างหนึ่งที่ทำให้การหมักชาคอมบูชาอาจได้ผลที่แตกต่างกันไปในแต่ละครั้ง รวมถึงการหมักชาคอมบูชาเป็นการหมักสองขั้นตอน ซึ่งยีสต์จะเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอทานอล จากนั้นเอทานอลจะถูกออกซิไดซ์โดยแบคทีเรียที่สร้างกรดอะซิติกเพื่อผลิตกรดอะซิติกในการหมักครั้งที่สอง การพยายามศึกษาหากระบวนการหมักชาดำคอมบูชาเพื่อให้ได้รสชาติ สี และกลิ่น ภายใต้ต้นทุนที่ต่ำเพื่อลดระยะเวลาการหมัก การใช้สมการทางคณิตศาสตร์มาช่วยในการทำนายและออกแบบกระบวนการจึงเป็นสิ่งที่สำคัญในอนาคต

สรุปผลการวิจัย

กระบวนการหมักชาดำคอมบูชาที่สภาวะปกติได้จากการใช้ชาดำในปริมาณ 3 กรัมต่อลิตร และปริมาณน้ำตาล 10% (w/v) ทำการเติมหัวเชื้อสกูบี้ 10% (v/v) จากนั้นทำการหมักที่อุณหภูมิห้อง ปริมาณยีสต์ที่พบในชาดำมีปริมาณสูงมากถึง $10x10^6$ CFU/ml ในการหมัก 7 วันแรก และเมื่อสิ้นสุดการหมัก ปริมาณยีสต์ในชาคอมบูชาที่ผลิตจากชาดำ มีจำนวนลดลงเท่ากับ $3.0x10^5$ CFU/ml น้ำชาดำคอมบูชามีรสชาติและลักษณะที่ดีที่เวลาการหมัก 8-11 วัน มีค่าพีเอชสุดท้ายเท่ากับ 3.30

และปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดอะซิติก (TA) สุดท้ายเท่ากับ 4.25 g/L มีค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (TSS) เท่ากับ 9.80°Brix และมีรสชาติเปรี้ยวอมหวาน ผลของการใช้คลื่นอัลตร้าโซนิคแบบ US pulse-US pause ในระหว่างการหมักที่เวลา 10 20 และ 30 นาทีต่อวัน ส่งผลให้ค่าปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วได้ค่าที่เหมาะสมที่สุดได้ในช่วงวันที่ 6, 6 และ 5 ตามลำดับ ซึ่งค่าพีเอชอยู่ในช่วง 2.87 – 2.90 ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดอะซิติกมีค่าสูงสุดเท่ากับ 4.52±0.035 g/L และค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (TSS) เท่ากับ 7.80±0.018°Brix เมื่อหมักชาดำคอมบูชาด้วยการทรีทด้วยคลื่นอัลตร้าโซนิคแบบ US pulse-US pause เป็นเวลา 30 นาทีต่อวัน ค่าความสว่าง (L^*) เมื่อเปรียบเทียบกับระยะเวลาในการหมักในวันที่ 0 และ 14 เมื่อทรีทด้วยคลื่นอัลตร้าโซนิคน้ำชาจะมีความสว่างมากขึ้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ปริมาณยีสต์ที่เกิดขึ้นทั้งในชาดำคอมบูชาที่หมักด้วยสภาวะปกติและสภาวะที่ใช้คลื่นอัลตร้าโซนิคมีแนวโน้มเป็นไปในทิศทางเดียวกัน ผลของการใช้คลื่นอัลตร้าโซนิคในระหว่างกระบวนการหมักสามารถลดระยะเวลาการหมักลงเหลือเพียง 5 วัน หรือเพิ่มประสิทธิภาพการหมักได้ถึงร้อยละ 60 เมื่อใช้คลื่นอัลตร้าโซนิคกระตุ้นแบบ US pulse-US pause เป็นรอบเวลา 30 นาทีต่อวัน โดยไม่มีผลต่อสีและรสชาติของน้ำชาดำคอมบูชาที่ได้ นอกจากนี้จลพลศาสตร์ของการผลิตกรดอะซิติกรูปแบบสมการเอกซ์โพเนนเชียลในรูป $A = A_0 e^{-kt}$ จากค่า R-Squared ที่สูงถึง 0.96 – 0.99 สามารถใช้เป็นแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่เหมาะสมในการอธิบายการเปลี่ยนแปลงของกรดในระหว่างกระบวนการหมักชาคอมบูชาด้วยชาดำซึ่งสามารถใช้เพื่อพัฒนากระบวนการผลิตให้ดีขึ้นต่อไปได้

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณคณะเทคโนโลยีการเกษตรและอาหาร มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม จังหวัดพิษณุโลก และ คณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ อุปกรณ์ และเครื่องมือวิเคราะห์ให้งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงผ่านไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

Ahmed, R. F., Hikal, M. S., & Abou-Taleb, K. A. (2020). Biological, chemical and antioxidant activities of different types Kombucha. Annals of Agricultural Sciences, *65*(1), 35-41.

Al Daccache, M., Koubaa, M., Salameh, D., Maroun, R. G., Louka, N., & Vorobiev, E. (2020). Ultrasound-assisted fermentation for cider production from Lebanese apples. *Ultrasonics Sonochemistry, 63,* 1-8.

BAM. 2001. Bacteriological Analytical Manual. 8th edition. USA: U.S. Food and Drug Administration.

Bartkiene, E., Bartkevics, V., Ikkere, L. E., Pugajeva, I., Zavistanaviciute, P., Lele, V., & Juodeikiene, G. (2018). The effects of ultrasonication, fermentation with Lactobacillus sp., and dehydration on the chemical composition and microbial contamination of bovine colostrum. *Journal of dairy science*, *101*(8), 6787 - 6798.

Chakravorty, S., Bhattacharya, S., Chatzinotas, A., Chakraborty, W., Kumar, V., & Joshi, V. (2016). Kombucha: Technology, Microbiology, Production, Composition and Therapeutic Value. *International Journal of Food and Fermentation Technology*, *6*(1), 13-24.

Cvetkovic, D., Markov, S., Djuri**Ć**, M., Savi**Ć**, D., & Veli**Ć**anski, A. (2008). Specific interfacial area as a key variable in scaling-up Kombucha fermentation. *Journal of Food Engineering*, *85*(3), 387-392. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.07.021

Dufresne, C., & Farnworth, E. (2000). Tea, Kombucha, and health: A review. *Food Research International - FOOD RES INT*, *33*, 409-421. https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00067-3

Huezo, L., Shah, A., & Michel Jr, F. C. (2019). Effects of Ultrasound on Fermentation of Glucose to Ethanol by Saccharomyces cerevisiae. *Fermentation, 5*(16), 1-14.

Jafari, R., Naghavi, N. S., Khosravi-Darani, K., Doudi, M., & Shahanipour, K. (2020). Kombucha microbial starter with enhanced production of antioxidant compounds and invertase. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *29*, 101789. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101789

Jayabalan, R., Marimuthu, S., Thangaraj, P., Sathishkumar, M., Binupriya, A. R., Swaminathan, K., & Yun, S. E. (2008). Preservation of Kombucha Tea—Effect of Temperature on Tea Components and Free Radical Scavenging Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(19), 9064-9071. https://doi.org/10.1021/jf8020893.

Liu, C.H., Hsu, W.H., Lee, F.L. and Liao, C.C. (1996). The isolation and identifi cation of microbes from a fermented tea beverage, Haipao, and their interactions during Haipao fermentation. *Food Microbiology*, *13*, 407-415.

Mason, T. J. (1998). Power ultrasound in food processing – the way forward. pp. 105-126. In “Ultrasound in Food Processing”. Povey, M. J. W. and Mason, T. J. (eds.). *Blackie Academic & Professional, London*.

Malbaša, R., Lončar, E., & Djurić, M. (2008). Comparison of the products of Kombucha fermentation on sucrose and molasses. *Food Chemistry, 106*(3), 1039-1045.

May, A., Narayanan, S., Alcock, J., Varsani, A., Maley, C., & Aktipis, A. (2019). Kombucha: a novel model system for cooperation and conflict in a complex multi-species microbial ecosystem. *PeerJ*, *7*, e7565.

Ojha, K. S., Mason, T. J., O’Donnell, C. P., Kerry, J. P., & Tiwari, B. K. (2017). Ultrasound technology for food fermentation applications. *Ultrasonics sonochemistry, 34*, 410-417.

Pawar, S. V., & Rathod, V. K. (2020). Role of ultrasound in assisted fermentation technologies for process enhancements. *Preparative Biochemistry & Biotechnology, 50*(6), 627-634.

Pitt, W. G., & Ross, S. A. (2003). Ultrasound increases the rate of bacterial cell growth. *Biotechnology progress*, *19*(3), 1038-1044.

Sirisa-ard, P., Bovonsombut, S., Kitipornchai, C., Natakarnkitkul, S., Tragoolpua, Y., Pukumpuang, W., Klawpiyapamornkun, T., & Kiatkarun, S. (2015). Development of Kombucha: fermented tea beverage. *International Journal of Tea Science (IJTS)*, *11*(1&2), 9-13.

Soto, V., Alejandra, S., Sandra, B., Jalloul, B., Jean-Pierre, S., & Patricia, T. (2018). Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. Journal of Food Science, *83*(3), 580-588.

Suriwong, V., Jaturonglumlert, S., Varith, J., Narkprasom, K., & Nitatwichit, C. (2020). Crystallisation behaviour of sunflower and longan honey with glucose addition by absorbance measurement. *International Food Research Journal*, *27*(4), 727-734.

Torán-Pereg, P., Del Noval, B., Valenzuela, S., Martinez, J., Prado, D., Perisé, R., & Arboleya, J. C. (2021). Microbiological and sensory characterization of kombucha SCOBY for culinary applications. *International Journal of Gastronomy and Food Science, 23,* 1-8.

Yan, Z., Zhong, Y., Duan, Y., Chen, Q., & Li, F. (2020). Antioxidant mechanism of tea polyphenols and its impact on health benefits. *Animal Nutrition*, *6*(2), 115-123.