

การคัดกรองและลักษณะเฉพาะของแบคทีเรียกรดแล็กติกในเทปาเซ
สูตรดัดแปลงโดยใช้วัตถุดิบท้องถิ่น

SCREENING AND CHARACTERIZATION OF LACTIC ACID BACTERIA
IN MODIFIED TEPACHE USING LOCAL RAW MATERIALS

ปัญญา ชัยรัตนพานิช^{1,2} ปิยะวดี สราภิรมย์¹ กุสุมาวดี ฐานเจริญ¹ กุลนรี ครองศรี³

ทรงกลด พลพวก⁴ และทรงวิทย์ หงสประภาส^{1,5*}

Panya Chairattanaphanich^{1,2}, Piyawadee Saraphirom¹, Kusumwadee Thancharoen¹

Kunnaree khongsri³, Songklot Phonphuak⁴ and Throngvid Hongsaprabhas^{1,5*}

บทคัดย่อ

เทปาเซ (Tepache) เครื่องดื่มท้องถิ่นของประเทศเม็กซิโกได้จากการหมักสับปะรด เป็นที่นิยมและผลิตในเชิงพาณิชย์เป็นเครื่องดื่มปราศจากแอลกอฮอล์ งานวิจัยนี้ได้ดัดแปลงสูตรและส่วนผสมของวัตถุดิบในการผลิตเทปาเซ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดกรองแบคทีเรียกรดแล็กติก (LAB) ในเทปาเซสูตรดัดแปลง ที่มีวัตถุดิบ (ร้อยละโดยปริมาตร) ดังนี้ หัวเขื่อน้ำคี้เฟอร์ ร้อยละ 5 สับปะรด ร้อยละ 20 น้ำมันแกว ร้อยละ 30 แก้วมังกรสีม่วง ร้อยละ 10 มังคุด ร้อยละ 5 แอปเปิ้ล ร้อยละ 10 น้ำตาลทราย ร้อยละ 10 น้ำ ร้อยละ 10 ทำการหมักในสภาวะไร้อากาศ นาน 48 ชั่วโมง ติดตามค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (TSS) ระหว่างการหมัก และเก็บตัวอย่างทุก ๆ 6 ชั่วโมง เพื่อนำไปคัดกรอง

¹คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม อำเภอเมือง จังหวัดมหาสารคาม 44000

¹Faculty of Science and Technology, Rajabhat Maha Sarakham University, Muang District, Maha Sarakham Province 44000

²บริษัท กรีนเดลี ฟู้ดส์ จำกัด อำเภอลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

²Greendeli Foods Co., Ltd. Khlong Luang District, Pathum Thani Province 12120

³คณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม อำเภอเมือง จังหวัดมหาสารคาม 44000

³Faculty of Education, Rajabhat Maha Sarakham University, Muang District, Maha Sarakham Province 44000

⁴คณะวิทยาการจัดการ มหาวิทยาลัยราชภัฏสุรินทร์ อำเภอเมือง จังหวัดสุรินทร์ 32000

⁴Faculty of Management Sciences, Surindra Rajabhat University, Surindra Rajabhat University, Mueang District, Surin Province 32000

⁵บริษัท สหพันธ์ เซ็นจูรี่ จำกัด เขตหลักสี่ กรุงเทพฯ 10210

⁵Sahapan Century Co., Ltd. Lak Si, Bangkok 10210

*corresponding author e-mail: throngvid.h@sahapan.co.th

Received: 26 August 2024; Revised: 26 November 2024; Accepted: 6 December 2024

DOI: <https://doi.org/10.14456/lsej.2024.35>

และศึกษาลักษณะเฉพาะของ LAB ผลการศึกษาพบว่า ค่า pH เท่ากับ 4.04 ถึง 4.51 และค่า TSS อยู่ในช่วง 9.87 ถึง 12.13 ร้อยละโดยน้ำหนักต่อปริมาตร ผลการนับจำนวนเซลล์พบว่าเพิ่มขึ้นจาก 2.30×10^8 เป็น 9.02×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เช่นเดียวกันกับจำนวนโคโลนีที่เพิ่มขึ้นจาก 4.33 เป็น 66.67 CFU ต่อมิลลิลิตร เมื่อเวลาหมักนานขึ้น ผลการคัดกรอง LAB พบ 9 ไอโซเลต คือแกรมบวกรูปกลม 4 ไอโซเลต และแกรมบวกรูปท่อน 5 ไอโซเลต โดยทุกไอโซเลตให้ผลคาตาเลสเป็นลบ

คำสำคัญ: แบคทีเรียกรดแล็กติก เทปาเช่ เครื่องดื่มผลไม้หมัก โพรไบโอติก

Abstract

Tepache, a traditional Mexican beverage made from fermented pineapple, is a popular non-alcoholic drink with growing commercial potential. This study aimed to modify the tepache formulation and screen for lactic acid bacteria (LAB) in the modified product. The optimized formula included kefir starter (5%), pineapple (20%), yam bean juice (30%), purple dragon fruit (10%), mangosteen (5%), apple (10%), sugar (10%), and water (10%) by volume. Fermentation was carried out under anaerobic conditions for 48 hours. Key parameters, including pH and total soluble solids (TSS), were monitored every 6 hours, alongside LAB screening and characterization. The pH decreased from 4.51 to 4.04, while TSS ranged from 12.13% to 9.87% (w/v) over the fermentation period. Microbial analysis showed an increase in cell density from 2.30×10^8 to 9.02×10^8 cells/mL and colony counts rising from 4.33 to 66.67 CFU/mL. Screening identified nine LAB isolates, including 4 cocci-shaped gram-positive and 5 rod-shaped gram-positive isolates, all catalase-negative. This study highlights the potential of modified tepache as a source of beneficial LAB strains for functional food applications.

Keywords: lactic acid bacteria, tepache, fermented fruit, probiotic

บทนำ

การหมักเป็นกระบวนการแปรรูปอาหารที่มีมาตั้งแต่อดีต ซึ่งช่วยยืดอายุการเก็บรักษาอาหาร และปรับปรุงลักษณะทางประสาทสัมผัส เช่น รสชาติและกลิ่น กระบวนการนี้ยังนำไปสู่การสร้างสารอาหาร และสารประกอบที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ เช่น โพรไบโอติก กรดอินทรีย์ และสารต้านอนุมูลอิสระ (Pérez-Armendáriz and Cardoso-Ugarte, 2020) เครื่องดื่มหมักแบบดั้งเดิมถือเป็นองค์ประกอบสำคัญของวัฒนธรรมและอาหารในหลายประเทศ โดยเฉพาะในเม็กซิโก ซึ่งมีเครื่องดื่มหมักหลากหลายประเภท เช่น เทปาเช่ (Tepache) ที่ได้รับการยอมรับในยุคปัจจุบันในฐานะเครื่องดื่มท้องถิ่นที่มีจุลินทรีย์โพรไบโอติก

ที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ (Ramírez-Guzmán et al., 2019; Aguilar-Uscanga et al., 2024) LAB บางสายพันธุ์ เช่น *Lactobacillus lactis*, *Enterococcus faecium* TeA2 และ *Lactobacillus pentosus* ABHEAU-05 ที่คัดแยกได้จากเทปาเซ มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกซึ่งมีความสามารถในการผลิตเปปไทด์ที่ต้านจุลินทรีย์อื่นได้ (Escobar-Ramírez et al., 2020)

เทปาเซเป็นเครื่องดื่มหมักที่มักผลิตจากเปลือกสับปะรด น้ำตาลทรายแดง และน้ำ พร้อมทั้งอาจเติมอบเชยหรือพริกไทยเพื่อเพิ่มรสชาติ กระบวนการหมักใช้จุลินทรีย์พื้นเมืองที่มีอยู่ในวัตถุดิบและสภาพแวดล้อม การหมักเทปาเซมักดำเนินการในถังไม้เป็นเวลา 4 วันที่อุณหภูมิห้อง ทำให้ได้เครื่องดื่มที่มีรสชาติเปรี้ยวอมหวานที่มาจากการหมักเปลือกสับปะรด กลิ่นหอม และคุณสมบัติที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ (Pérez-Armendáriz & Cardoso-Ugarte, 2020) และยังสามารถปรับแต่งรสชาติได้หลากหลาย ผลของระดับกลูโคสและคุณภาพทางประสาทสัมผัสของเทปาเซที่ผลิตจากเปลือกสับปะรดจากการแปรผันปริมาณน้ำตาลและระยะเวลาการหมัก พบว่า การควบคุมปริมาณน้ำตาลและระยะเวลาการหมักมีผลสำคัญต่อระดับกลูโคสและคุณภาพทางประสาทสัมผัสของเทปาเซ ซึ่งเทปาเซสูตรที่ใช้ น้ำตาลร้อยละ 15 และหมัก 48 ชั่วโมง เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตเทปาเซที่มีคุณภาพดีและตอบสนองความต้องการของผู้บริโภค (Sabira & Suryani, 2023)

ทั้งนี้ ในประเทศไทย เทปาเซ (Tepache) ยังไม่ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลาย แต่เริ่มเป็นที่สนใจในฐานะเครื่องดื่มหมักทางเลือกที่ตอบโจทย์เทรนด์สุขภาพ เนื่องจากเทปาเซมีคุณสมบัติที่โดดเด่น เช่น การมีจุลินทรีย์โพรไบโอติกซึ่งส่งเสริมระบบทางเดินอาหาร รสชาติเปรี้ยวอมหวานที่มาจากกระบวนการหมัก และความสามารถในการปรับแต่งรสชาติที่หลากหลาย จึงทำให้เหมาะสำหรับกลุ่มผู้บริโภคที่ใส่ใจสุขภาพ (Romero-Luna et al., 2022) โดยเทรนด์เครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ เช่น คอมบูชา (Kombucha) และคีเฟอร์ (Kefir) ซึ่งเน้นการมีจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ต่อระบบทางเดินอาหารกำลังเติบโตในตลาดประเทศไทย (Watcharapoj & Runchida, 2019) ดังนั้น เทปาเซจึงมีศักยภาพที่จะพัฒนาและเป็นที่ยอมรับในตลาดเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพในอนาคต โดยการปรับแต่งรสชาติด้วยวัตถุดิบที่หลากหลายมากขึ้นเพื่อให้มีเอกลักษณ์เฉพาะตัว และเพื่อเพิ่มความหลากหลายของจุลินทรีย์โพรไบโอติกและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพให้หลากหลายมากขึ้น

นอกจากนี้ เทปาเซ ยังเป็นเครื่องดื่มหมักที่มีโครงสร้างทางชุมชนจุลินทรีย์ที่ซับซ้อน อันเกิดจากการทำงานร่วมกันของจุลินทรีย์หลายกลุ่ม ได้แก่ LAB แบคทีเรียกรดอะซิติก และยีสต์หลากหลายสายพันธุ์ (Lara-Hidalgo et al., 2017) โดยเฉพาะ LAB บางสายพันธุ์ที่มีบทบาทสำคัญในการผลิตสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิระหว่างกระบวนการหมัก ซึ่งมีคุณสมบัติส่งเสริมสุขภาพ ได้แก่ กรดแล็กติก สารต้านอนุมูลอิสระ และเปปไทด์ต้านจุลินทรีย์ (Fuente-Salcido et al., 2015; Thongprayoon et al., 2019) อย่างไรก็ตาม โครงสร้างชุมชนจุลินทรีย์ (microbial community) ที่ซับซ้อนในเทปาเซ ยังคงมีปัญหาด้านความไม่เสถียรของโครงสร้างและกลไกปฏิสัมพันธ์ที่ยังไม่เป็นที่เข้าใจ ส่งผลให้ประสิทธิภาพในเทปาเซ

ยังไม่เป็นที่น่าพอใจ การวิจัยในอนาคตจึงควรมุ่งเน้นการสร้างการหมักที่มีโครงสร้างทางจุลินทรีย์ที่เปลี่ยนแปลงการหมักตามธรรมชาติและสามารถตอบสนองความต้องการของผู้บริโภคที่หลากหลายเพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มหมักแนวใหม่ในอนาคต (Li et al., 2024)

แม้จะมีข้อมูลเกี่ยวกับ LAB ในเทปาเซในรายงานที่ผ่านมา แต่ยังมีข้อจำกัดในความเข้าใจเกี่ยวกับลักษณะทางกายภาพ เคมี และความหลากหลายของ LAB ที่เปลี่ยนแปลงไปหลังการหมักตามธรรมชาติ ซึ่งต้องการการวิจัยเพิ่มเติมเพื่อสนับสนุนการพัฒนาผลิตภัณฑ์ของเครื่องดื่มชนิดนี้ ดังนั้นการวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการพัฒนาเทปาเซสูตรดัดแปลงโดยใช้วัตถุดิบในท้องถิ่น เช่น สับปะรด แก้วมังกร มังคุด และมันแกว เพื่อสร้างเอกลักษณ์เฉพาะตัวของเครื่องดื่มเทปาเซ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาและคัดกรอง LAB ซึ่งเกิดจากกระบวนการหมักตามธรรมชาติ โดยจะทำการศึกษาลักษณะเฉพาะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของ LAB คัดแยกได้ ซึ่งข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้อาจจะเป็นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยสร้างผลิตภัณฑ์ที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพทางเลือกได้

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมหัวเชื้อน้ำคีเฟอร์

เตรียมหัวเชื้อน้ำคีเฟอร์ (water kefir) จากวัตถุดิบและวิธีการ ดังนี้ วัตถุดิบ: เปลือกและแกนแอปเปิลสดที่ล้างสะอาด ร้อยละ 60 โดยปริมาตร น้ำตาลทรายแดง ร้อยละ 40 โดยปริมาตร วิธีการ: ใส่เปลือกและแกนแอปเปิลสดลงในภาชนะที่มีฝาปิดสนิทขนาด 3 ลิตร และผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นโรยน้ำตาลทรายแดงที่ด้านบน กำหนดปริมาตรการทำงาน (working volume) รวม 1.5 ลิตร ปิดฝาให้สนิท วางในสถานที่อากาศถ่ายเท หลีกแสงแดด ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดกระบวนการหมักที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30-35 องศาเซลเซียส) นาน 5-7 วัน จากนั้นนำมากรองโดยใช้ถุงกรองผ้าในล่อน (filter bag) ขนาด 30 ไมครอน ใช้น้ำเป็นหัวเชื้อน้ำคีเฟอร์ในการผลิตเทปาเซ

2. การเตรียมวัตถุดิบ

2.1 การเตรียมน้ำมันแกว โดยนำหัวมันแกวสดมาล้าง ปอกเปลือกและหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ จากนั้นนำมาสกัดเฉพาะน้ำมันแกวโดยใช้เครื่องปั่นแยกกาก (มันแกวสด 3 กิโลกรัม สกัดน้ำมันแกวได้ 1 ลิตร) นำน้ำมันแกวมาต้มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

2.2 การเตรียมผลไม้อื่น ๆ โดยการล้างทำความสะอาด หั่นผลไม้ทุกชนิดเป็นชิ้นขนาดประมาณ 1 x 1 เซนติเมตร ทำการเตรียม ดังนี้ 1) สับปะรด: ล้างทำความสะอาด ตัดส่วนก้านและใบออก ใช้ทั้งเปลือกและเนื้อผล 2) แก้วมังกรสีม่วง: ล้างทำความสะอาด ปอกส่วนผิวเปลือกผลด้านนอกออก ใช้ทั้งเปลือกส่วนในและเนื้อผล 3) มังคุด: ล้างทำความสะอาด ปอกส่วนผิวเปลือกแข็งด้านนอกออก ใช้ทั้งเปลือกส่วนในและเนื้อผล 4) แอปเปิล: ใช้ทั้งเปลือกและเนื้อผล

3. กรรมวิธีการผลิตเทปแช่สูตรดัดแปลง

ผสมหัวเชื้อน้ำคีเฟอร์ (water kefir) และวัตถุดิบทั้งหมด จากข้อ 1-2 โดยมีส่วนผสม (ร้อยละโดยปริมาตร) ดังนี้ หัวเชื้อน้ำคีเฟอร์ (ร้อยละ 5) สับปะรด (ร้อยละ 20) น้ำมันแกว (ร้อยละ 30) แก้วมังกรสีม่วง (ร้อยละ 10) มังคุด (ร้อยละ 5) แอปเปิ้ล (ร้อยละ 10) น้ำตาลทราย (ร้อยละ 10) น้ำ (ร้อยละ 10) จากนั้นทำการหมักโดยใส่หัวเชื้อน้ำคีเฟอร์และวัตถุดิบทั้งหมดรวมกันในภาชนะที่มีฝาปิดสนิทขนาด 20 ลิตร และผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตรการทำงาน (working volume) รวม 10 ลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ติดตามค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (TSS) ระหว่างการหมัก และเก็บตัวอย่างน้ำหมักทุก ๆ 6 ชั่วโมง เพื่อนำไปคัดกรองและศึกษาลักษณะเฉพาะของ LAB

กรองเทปแช่สูตรดัดแปลงโดยใช้ถุงกรองผ้าไนลอน (filter bag) ขนาด 30 ไมครอน บรรจุขวดแก้วที่มีฝาปิดชนิดทนแรงดันก๊าซ ทำการพาสเจอร์ไรซ์โดยวิธีใช้ความร้อนสูง-เวลาสั้น (HTST: High Temperature-Short Time) ที่อุณหภูมิ 70-72 องศาเซลเซียส คงไว้เป็นเวลา 15 วินาทีเพื่อให้ได้เครื่องดื่มเทปแช่ ก่อนนำไปศึกษาลักษณะเฉพาะของเทปแช่ โดยการสังเกตลักษณะภายนอก สี ความใส ปริมาณตะกอน กลิ่น และการชิมรสชาติ

4. การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของเทปแช่สูตรดัดแปลง

โดยติดตามการเปลี่ยนแปลงค่า pH และค่า TSS โดยใช้ pH meter และเครื่องมือสำหรับการวัดความหวาน (Brix refractometer)

5. การคัดกรองและการศึกษาลักษณะเฉพาะของ LAB

5.1 ขั้นตอนการคัดกรอง LAB โดยใช้ MRS agar

เก็บตัวอย่างน้ำหมักที่ต้องการคัดกรอง เขย่าหรือผสมตัวอย่างให้สม่ำเสมอ เพื่อให้เชื้อกระจายตัว จากนั้นเจือจางตัวอย่าง (serial dilution) ในน้ำเกลือปลอดเชื้อ (sterile saline) เพื่อลดปริมาณเชื้อให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมต่อการนับจำนวน

5.2 การเพาะเชื้อบน MRS agar

ใช้ MRS agar มีองค์ประกอบในส่วนผสมของอาหารต่อปริมาตร 1 ลิตร ดังนี้ proteose peptone 10 กรัม beef extract 10 กรัม yeast extract 5 กรัม dextrose 20 กรัม polysorbate 80 1 กรัม ammonium citrate 2 กรัม sodium acetate 5 กรัม magnesium sulphate 0.1 กรัม manganese sulphate 2 กรัม dipotassium phosphate 12 กรัม agar 12 กรัม ปรับค่า pH 6.5±0.2 (Goyal et al., 2012)

ใช้เทคนิคการเทจาน (pour plate technique) โดยกระจายตัวอย่างเจือจางลงบนพื้นผิวของ MRS agar ในจานเพาะเชื้อ ซึ่ง บ่มที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้ออกซิเจน (anaerobic conditions) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการสังเกตลักษณะโคโลนีหลังการบ่ม คัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะ ได้แก่ รูปร่างกลม ขอบเรียบ หรือไม่เรียบ สีครีมหรือสีขาวขุ่น โคโลนีที่เลือกจะถูกเก็บ

แยกไปวิเคราะห์ต่อ นับจำนวนโคโลนีแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนพื้นผิวของ MRS agar และนับจำนวนเซลล์แบคทีเรีย โดยปิเปตตัวอย่างลงบนสไลด์แบบ Petroff-Hausser counting chamber จากนั้นนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์แล้วคำนวณจำนวนเซลล์ ตามวิธีของ Zellner et al., 1963

5.3 การคำนวณจำนวนเซลล์ด้วย Petroff-Hausser counting chamber มีขั้นตอนดังนี้

5.3.1 เตรียมตัวอย่างจุลินทรีย์ที่ต้องการนับ โดยอาจต้องเจือจางตัวอย่างเพื่อให้ได้จำนวนเซลล์ในช่วงที่นับได้สะดวก (100–200 เซลล์ต่อช่องนับ) ผสมตัวอย่างให้สม่ำเสมอก่อนเติมลงใน chamber

5.3.2 เตรียม Petroff-Hausser counting chamber โดยทำความสะอาด counting chamber และ coverslip ด้วยแอลกอฮอล์หรือน้ำกลั่น วาง coverslip ให้ติดสนิทกับ counting chamber โดยดูว่าเกิด Newton's rings (แถบสีรุ้ง) บริเวณขอบ

5.3.3 เติมตัวอย่าง โดยใช้ปิเปตเติมตัวอย่างจุลินทรีย์ลงใน chamber อย่างระมัดระวัง ปริมาณที่เติมควรเพียงพอให้ครอบคลุมพื้นที่นับแต่ไม่ล้น รอให้เซลล์กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ

5.3.4 ส่องกล้องจุลทรรศน์ โดยใช้กำลังขยาย 40x หรือ 100x เพื่อดูพื้นที่การนับ เลือกช่องนับที่เหมาะสม

5.3.5 นับจำนวนเซลล์ โดยนับเซลล์ในกริดขนาด 1 ตารางมิลลิเมตร (แบ่งย่อยเป็น 25 ตารางเล็ก แต่ละตารางเล็กมีขนาด 0.2×0.2 มิลลิเมตร) ใช้กฎในการนับเซลล์ที่ขอบ เช่น นับเฉพาะเซลล์ที่แตะเส้นขอบด้านบนและด้านซ้ายเท่านั้น เพื่อลดการนับซ้ำ

5.3.6 คำนวณความเข้มข้นของเซลล์ โดยใช้สูตร

$$\text{ความเข้มข้นเซลล์ (เซลล์/มิลลิลิตร)} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่นับได้ (เซลล์)} \times \text{อัตราการเจือจาง}}{\text{จำนวนช่อง} \times \text{ปริมาตร}}$$

โดย ปริมาตรต่อช่อง (volume per square) = 1 ตารางมิลลิเมตร $\times$ 0.2 มิลลิเมตร = 0.02 ลูกบาศก์มิลลิเมตร = 0.02×10^{-3} มิลลิลิตร

อัตราการเจือจาง = อัตราที่ตัวอย่างเจือจางก่อนเติมลงใน chamber

5.4 การยืนยันลักษณะของแบคทีเรีย

หลังการคัดกรองแบคทีเรียบน MRS agar จำเป็นต้องมีการยืนยันว่าเป็น LAB โดยใช้การวิเคราะห์เพิ่มเติม ได้แก่ 1) การศึกษาลักษณะโคโลนี 2) การย้อมแกรม (gram staining) เพื่อตรวจสอบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวก 3) การตรวจสอบ catalase test เพื่อแยก LAB ที่ไม่ผลิตเอนไซม์คาตาเลส (catalase-negative) (Whittenbury, 1964) และ 4) morphological observation เพื่อตรวจลักษณะรูปร่าง เช่น รูปกลม (cocci) หรือรูปท่อน (rods)

ผลการวิจัย

1. ลักษณะเฉพาะของเครื่องต้มเทปาเข้าสู่ตรดัดแปลง

ลักษณะปรากฏของเครื่องต้มเทปาเข้าสู่ตรดัดแปลง พบว่ามีสีแดงจากสีของผลไม้ ได้แก่ เปลือกแก้วมังกรสีม่วง เปลือกมังคุด ค่อนข้างใส และสังเกตเห็นตะกอนเล็กน้อยที่ก้นขวด ที่ช่องว่างด้านบน (head space) ของขวดแก้วมีฟองก๊าซสีขาว ซึ่งอาจเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เกิดขึ้นจากกระบวนการหมัก เมื่อเปิดฝาขวดจะมีแรงดันคล้ายเปิดขวดน้ำอัดลม รสชาติหวานอมเปรี้ยว หอมกลิ่นผลไม้ที่ใช้เป็นวัตถุดิบ และมีความขุ่นเล็กน้อยจากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ดังภาพที่ 1 (Figure 1)



Figure 1 Tepache - a fermented fruit beverage.

ผลจากกิจกรรมทางเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักทำให้ค่า pH มีแนวโน้มลดลง แสดงให้เห็นถึงการเพิ่มขึ้นของกรดอินทรีย์จากกระบวนการหมัก ทำให้เทปาเซ่มีรสเปรี้ยวเล็กน้อย ในขณะที่ความหวานของเทปาเซ่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในช่วงเริ่มต้นของการหมัก ซึ่งเป็นผลจากน้ำตาลและการสลายตัวและการละลายของสารอินทรีย์และสารอาหารจากวัตถุดิบ รวมถึงการผลิตสารใหม่ ๆ จากจุลินทรีย์

2. ผลการคัดกรองและการศึกษาลักษณะเฉพาะของ LAB

การศึกษานี้มีเป้าหมายเพื่อคัดกรองและวิเคราะห์ลักษณะเฉพาะของ LAB ที่ได้จากกระบวนการหมักเทปาเข้าสู่ตรดัดแปลง เพื่อประเมินศักยภาพในการพัฒนาเป็นโพรไบโอติก ในการวิเคราะห์ชีวเคมี พบว่ามีความสามารถในการผลิตกรดอย่างมีนัยสำคัญ โดยค่า pH ลดลงในช่วง 48 ชั่วโมง ค่า pH ลดลงจาก 4.51 เป็น 4.04 ในขณะที่ค่า TSS เพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วงแรกของการหมัก (48 ชั่วโมง) จำนวนเซลล์และจำนวนโคโลนีของ LAB เพิ่มขึ้นจาก 2.30×10^8 เป็น 9.02×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และ 4.33 เป็น 66.67 CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1 (Table 1)

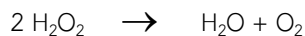
Table 1 Characteristics and results of microbial observation of Tepacha.

Fermentation time (h)	pH		TSS* (% w/v)		Bacterial cell counting (cell/ml)		CFU counting (CFU/ml)	
	Average	S.D.**	Average	S.D.**	Average	S.D.**	Average	S.D.**
0	4.51	0.03	10.40	0.20	2.03	0.70	4.33	0.58
6	4.51	0.02	9.87	0.23	3.99	1.20	5.67	2.08
12	4.24	0.02	11.00	0.00	4.55	0.65	14.00	1.00
18	4.24	0.03	10.90	0.00	4.66	0.45	38.67	5.51
24	4.16	0.02	11.13	0.06	6.11	0.10	41.67	10.07
36	4.16	0.05	11.10	0.10	8.53	0.75	56.00	7.00
48	4.04	0.02	12.13	0.12	9.02	1.00	67.67	8.96

Remark *Total soluble solids; **Standard deviation.

LAB ถูกแยกได้จากตัวอย่างเหपाเชื้อสตรดัดแปลงโดยใช้ MRS agar และได้โคโลนี 9 รูปแบบที่แตกต่างกัน โดยแบ่งเป็น แบคทีเรียแกรมบวกรูปกลม (gram-positive cocci) จำนวน 4 ไอโซเลต และแบคทีเรียแกรมบวกรูปท่อน (gram-positive rods) จำนวน 5 ไอโซเลต โดยมีผลการวิเคราะห์คุณสมบัติทางชีวเคมี พบว่าทุกไอโซเลตให้ผลลบ (catalase-negative) คือโคโลนี LAB ที่คัดกรองได้ไม่สร้างฟองเมื่อทำการทดสอบคาตาเลส (catalase test) ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ซึ่งเป็นการยืนยันถึงการเป็น LAB ที่เมื่อทำการย้อมแกรมพบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวก และไม่สร้างเอนไซม์คาตาเลส ซึ่งจะแปลงไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้เป็นน้ำ (H₂O) และก๊าซออกซิเจน (O₂) หากมีคาตาเลสจะผลิตก๊าซออกซิเจนทำให้เกิดฟองอากาศ ดังสมการ

catalase



ผลการศึกษาลักษณะเฉพาะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีและชีวเคมีของ LAB ที่เจริญบน MRS agar ซึ่งมีลักษณะเฉพาะที่สามารถใช้ในการคัดกรองและแยกชนิดของแบคทีเรียกลุ่ม LAB ได้ ผลการคัดกรองและการศึกษาลักษณะเฉพาะบางประการของ LAB พบว่าขนาดของโคโลนี มีขนาดเล็กถึงปานกลาง (เส้นผ่านศูนย์กลาง 1-3 มิลลิเมตร) โคโลนีมีการกระจายตัวค่อนข้างสม่ำเสมอ สีของโคโลนีมีสีครีม สีขาว หรือสีขุ่นเล็กน้อย สีโคโลนีไม่เข้มจัด มีความโปร่งแสงเล็กน้อย รูปร่างของโคโลนี ส่วนใหญ่มีรูปร่างกลม (circular) ขอบเรียบ (entire margins) และมีขอบเขตชัดเจน ผิวสัมผัสของโคโลนีพบว่า มีพื้นผิวเรียบ (smooth) บางโคโลนีมีผิวสัมผัสแบบมันเงาเล็กน้อย (shiny appearance) ดังตารางที่ 2 (Table 2)

Table 2 Screening and characterization of LAB in modified Tepache formulation.

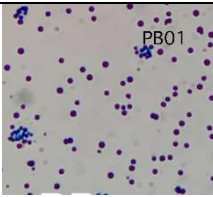
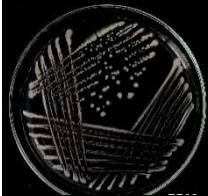
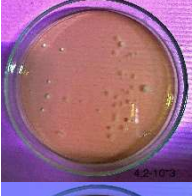
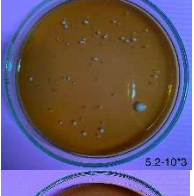
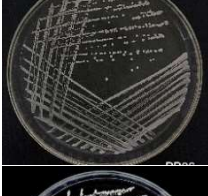
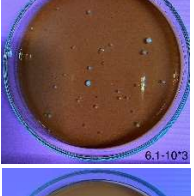
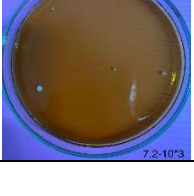
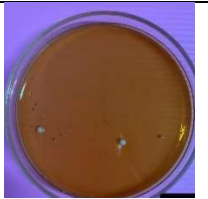
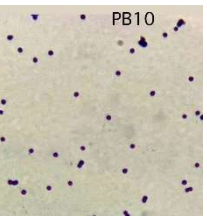
Isolate code	Results of LAB morphology			Results of LAB characteristic
PB01				Gram positive Coccus shape Catalase-negative
PB02				Gram positive Rod shape Catalase-negative
PB03				Gram positive Rod shape Catalase-negative
PB04				Gram positive Rod shape Catalase-negative
PB05				Gram positive Coccus shape Catalase-negative
PB06				Gram positive Rod shape Catalase-negative
PB07				Gram positive Rod shape Catalase-negative

Table 2 Screening and characterization of LAB in modified Tepache formulation. (cont.)

Isolate code	Results of LAB morphology		Results of LAB characteristic
PB09			 Gram positive Cocci shape Catalase-negative
PB10			 Gram positive Cocci shape Catalase-negative

อภิปรายผล

1. การพัฒนาต่อยอดเทปาเช่

การพัฒนาต่อยอดผลิตภัณฑ์เทปาเช่ที่ใช้วัตถุดิบท้องถิ่นควรเน้นสร้างเอกลักษณ์เฉพาะตัวในด้านรสชาติ สี กลิ่น และประโยชน์ต่อสุขภาพ เพื่อดึงดูดผู้บริโภคและเพิ่มมูลค่าให้กับผลิตภัณฑ์นั้น ประเทศไทยมีศักยภาพสูงในการพัฒนาเครื่องดื่มผลไม้หมัก เนื่องจากความหลากหลายของผลไม้และวัตถุดิบท้องถิ่น เช่น ผลไม้ที่มีรสเปรี้ยว หวานเฉพาะตัว (มะม่วงเบา มะขามเปียก ลำไย) ใช้วัตถุดิบที่ให้สีธรรมชาติ เช่น สีม่วงจากแก้วมังกร สีเหลืองจากขมิ้น หรือสีแดงจากกระเจี๊ยบแดง เพื่อลดการใช้สีสังเคราะห์ หรือสามารถเน้นกลิ่นเฉพาะตัวของสมุนไพรหรือผลไม้ท้องถิ่น เช่น กลิ่นหอมจากใบเตย ตะไคร้ หรือขิง ที่ให้กลิ่นหอมเฉพาะตัว เพื่อสร้างรสชาติที่โดดเด่น รวมถึงกระแสความนิยมที่เพิ่มขึ้นในเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพและสินค้าที่สะท้อนอัตลักษณ์ท้องถิ่น แนวโน้มที่สำคัญในประเทศไทย ได้แก่

1.1 ความนิยมในเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ ที่กระแสสุขภาพที่เพิ่มขึ้นทำให้ผู้บริโภคหันมาสนใจเครื่องดื่มที่มีคุณสมบัติช่วยส่งเสริมสุขภาพ เช่น การสนับสนุนระบบทางเดินอาหาร การเพิ่มภูมิคุ้มกัน และสารต้านอนุมูลอิสระ การพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่มีคุณสมบัติเชิงหน้าที่ (functional properties) เช่น การเสริมโปรไบโอติกและพรีไบโอติก ในเครื่องดื่มผลไม้หมัก (Romero-Luna et al., 2022; Sabira and Suryani, 2023)

1.2 การใช้วัตถุดิบท้องถิ่นที่หลากหลาย เนื่องจากผลไม้ไทยที่มีศักยภาพสูง เช่น มะม่วง แก้วมังกร มังคุด สับปะรด หรือผลไม้เมืองร้อนอื่น ๆ ที่สามารถให้รสชาติ กลิ่น และสีที่เป็นเอกลักษณ์ การใช้ส่วนเหลือจากผลไม้ (by-products) เช่น เปลือกผลไม้หรือเนื้อผลไม้เหลือใช้ในกระบวนการผลิต

หรือผลพลอยได้ในอุตสาหกรรมแปรรูปผักและผลไม้ ช่วยลดของเสียและเพิ่มความยั่งยืน (Álvarez et al., 2021; Velázquez-Quiñones et al., 2021)

1.3 การพัฒนากระบวนการผลิตที่เหมาะสมกับภูมิอากาศไทย โดยปรับปรุงกระบวนการหมักให้เหมาะสมกับสภาพอากาศร้อนชื้น เพื่อป้องกันการปนเปื้อนและเพิ่มความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ การใช้เทคโนโลยีการหมัก เช่น การควบคุมอุณหภูมิและความดัน เพื่อปรับปรุงรสชาติและคุณภาพ

1.4 การสนับสนุนและส่งเสริมสินค้า SMEs และผลิตภัณฑ์ท้องถิ่น ส่งเสริมการใช้วัตถุดิบในชุมชนเพื่อเพิ่มมูลค่าและสนับสนุนเศรษฐกิจฐานราก การวิจัยและพัฒนา ร่วมกับมหาวิทยาลัย เช่น การคัดกรองจุลินทรีย์และการพัฒนาสูตรที่เหมาะสม ตลอดจนกระแสนิยมของผู้บริโภคเจนเอเรชั่นใหม่ ที่ให้ความสนใจเรื่องตีมี่เรื่องราว (storytelling) ผู้บริโภครุ่นใหม่ให้ความสำคัญกับผลิตภัณฑ์ที่มีที่มาชัดเจน เช่น ผลิตจากชุมชนในภาคเหนือหรืออีสาน การนำเสนอผลิตภัณฑ์ที่สร้างประสบการณ์ เช่น การพัฒนารสชาติที่แปลกใหม่ (exotic flavors) หรือการจัดกิจกรรมทดลองหมักเครื่องดื่ม

2. การคัดกรองและการศึกษาลักษณะเฉพาะของ LAB

2.1 การคัดกรอง LAB และการวิเคราะห์เชิงปริมาณ

จากผลการคัดกรอง พบว่าในกระบวนการหมักเตปาะเชื้อสเตรดัดแปลงสามารถแยก LAB ที่แตกต่างกันทั้งหมด 9 ไอโซเลต จำนวนเซลล์ LAB และโคลนีสสูงที่สุดในตัวอย่าง เท่ากับ 9.02×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และ 67.67 CFUต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งสะท้อนถึงการเจริญเติบโตของ LAB ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในระหว่างกระบวนการหมัก การที่ LAB เจริญเติบโตได้ดีในสภาวะหมักระบบปิดนั้น แสดงให้เห็นว่าส่วนผสมและสภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการสร้างกรดแล็กติก ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในการควบคุมค่า pH ในกระบวนการหมัก

ผลการคัดกรอง LAB ในการศึกษาสามารถแยก LAB ได้ค่อนข้างหลากหลายเมื่อเปรียบเทียบกับเตปาะเช่แบบดั้งเดิมที่มีวัตถุดิบหลักเป็นเนื้อสัตว์สด โดยในรายงานของ de la Fuente-Salcido et al. (2015) พบ LAB สายพันธุ์หลักสองชนิด เช่น *L. lactis* และ *E. faecium* ในเครื่องดื่มเตปาะเช่ LAB เหล่านี้มีศักยภาพในการผลิตแบคทีเรียโอซินซึ่งแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่มีความสำคัญทางคลินิก LAB บางสายพันธุ์ เช่น *L. lactis*, *E. faecium* TeA2 และ *L. pentosus* ABHEAU-05 ที่คัดแยกได้จากเตปาะเช่ มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกซึ่งมีความสามารถในการผลิตเปปไทด์ที่ต้านจุลินทรีย์อื่นได้ (Escobar-Ramírez et al., 2020) อย่างไรก็ตาม โครงสร้างและความหลากหลายของกลุ่มจุลินทรีย์ในเตปาะเช่ค่อนข้างซับซ้อน เมื่อวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค 16S rRNA และ ITS ผ่าน Illumina MiSeq 2 × 300 พบว่า มีความหลากหลายของแบคทีเรียมากขึ้นเมื่อสิ้นสุดการหมัก โดยกลุ่มจุลินทรีย์ในช่วง 72 ชั่วโมงมีแบคทีเรียกลุ่มหลัก ได้แก่ *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Acetobacter* และ *Lactococcus* (Gutiérrez-Sarmiento et al., 2022)

2.2 ค่า pH และความเข้มข้น TSS

ค่า pH ของเทปาเซในกระบวนการหมักมีค่าลดลงและคงตัวในช่วง 4.04–4.51 หลังจาก 48 ชั่วโมง สะท้อนถึงความสามารถของ LAB ในการผลิตกรดอินทรีย์ เช่น กรดแล็กติก ซึ่งเป็นผลจากกระบวนการหมักน้ำตาลในส่วนผสม สำหรับค่า TSS ซึ่งอยู่ในช่วงร้อยละ 9.87–12.13 โดยปริมาณอาจเพิ่มขึ้นจากการปลดปล่อยสารที่ละลายน้ำ เช่น สารอินทรีย์ที่มาจากผลไม้และน้ำตาลที่ไม่ได้ถูกใช้หมดในกระบวนการหมัก ทั้งนี้ การเปลี่ยนแปลงค่า TSS อาจมีผลต่อรสชาติ ความหวาน และกลิ่นของผลิตภัณฑ์ อย่างไรก็ตาม หากเพิ่มระยะเวลาในการหมักจะทำให้ลักษณะทางกายภาพและเคมีของเทปาเซเปลี่ยนแปลงไป การวิจัยของ Gutiérrez-Sarmiento et al. (2022) แสดงให้เห็นว่า เทปาเซมีความสัมพันธ์ทางเคมีเปลี่ยนแปลงไป ภายหลังจากหมัก 72 ชั่วโมง โดยมีค่า TSS ลดลง และค่าความเป็นกรดเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน ปริมาณเอทานอล กรดอะซิติก และกรดแล็กติก เพิ่มขึ้น ขณะที่ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลดลง

2.3 ลักษณะเฉพาะของ LAB ที่คัดกรองได้

แบคทีเรีย LAB ทุกไอโซเลตที่ตรวจพบเป็น catalase-negative สะท้อนลักษณะเฉพาะของ LAB ที่ไม่สามารถผลิตเอนไซม์คาตาเลส ได้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้เกี่ยวกับแบคทีเรียในกลุ่มนี้ ลักษณะโคโลนีของ LAB ที่เจริญบน MRS agar แสดงความหลากหลายในขนาด รูปร่าง สี และความมันวาว ซึ่งช่วยในการแยกและคัดเลือกลายพันธุ์ LAB โดยการใช้อัลลอยจุลทรรศน์ยังช่วยยืนยันรูปร่างของเซลล์ให้สอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย (Oviedo-León et al., 2024)

2.4 ความสำคัญของ LAB ต่อคุณภาพของเทปาเซ

LAB มีบทบาทสำคัญในกระบวนการหมักและพัฒนาคุณภาพของเครื่องดื่มเทปาเซทั้งในแง่ของรสชาติ กลิ่น สี และคุณสมบัติเพื่อสุขภาพ การผลิตกรดแล็กติกช่วยปรับสมดุลค่า pH และลดโอกาสการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่ไม่พึงประสงค์ (Thongsprayoon et al., 2019)

2.5 แนวทางการพัฒนาต่อยอด

การคัดกรอง LAB ที่มีศักยภาพสามารถนำไปพัฒนาเป็นหัวเชื้อ (starter culture) สำหรับการผลิตเทปาเซในระดับอุตสาหกรรม นอกจากนี้ การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีเพิ่มเติม เช่น ความสามารถในการทนต่อกรดหรือการสร้างสารต้านจุลชีพ จะช่วยยกระดับความปลอดภัยและคุณค่าทางสุขภาพของผลิตภัณฑ์ อีกทั้งยังสามารถพัฒนาเทปาเซให้เป็นเครื่องดื่มที่มีเอกลักษณ์โดยใช้วัตถุดิบท้องถิ่น

สรุปผลการวิจัย

1. เครื่องดื่มเตปาเช่สูตรดัดแปลงในการศึกษานี้มีลักษณะสีแดงใสจากวัตถุดิบผลไม้ ได้แก่ แก้วมังกรสีม่วงและมังคุด และค่อนข้างใส อาจมีตะกอนเล็กน้อยที่ก้นขวดจากกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ ในขั้นตอนบรรจุขวด สีแดงใสของเครื่องดื่มเตปาเช่สูตรดัดแปลงนี้ แตกต่างจากสีของเตปาเช่แบบดั้งเดิม ที่ทำจากสับปะรดเป็นหลักที่มีสีคล้ายน้ำชาสีเข้ม ๆ ซึ่งลักษณะดังกล่าวอาจเป็นอัตลักษณ์ที่ดึงดูดใจสำหรับผู้บริโภคบางกลุ่ม นอกจากนี้ยังมีฟองก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์บริเวณช่องว่างด้านบนของขวดที่คล้ายการเติมน้ำอัดลม รสชาติหวานอมเปรี้ยว มีกลิ่นผลไม้และความซ่าเล็กน้อย รสชาติหวาน มีรสเปรี้ยวเล็กน้อยและดื่มง่าย เหมาะสำหรับการพัฒนาต่อยอดเครื่องดื่มเตปาเช่ที่ใช้วัตถุดิบท้องถิ่นที่ควรเน้นสร้างเอกลักษณ์เฉพาะตัวในด้านรสชาติ สี กลิ่น และประโยชน์ต่อสุขภาพ เพื่อดึงดูดผู้บริโภคและเพิ่มมูลค่าให้กับผลิตภัณฑ์นั้น

2. ส่วนผสมของวัตถุดิบที่นำมาผลิตเตปาเช่สูตรดัดแปลงและสภาพแวดล้อมของการหมักเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ LAB สังเกตได้จากการที่ค่า pH ลดลง ในขณะที่ความหนาแน่นของเซลล์ LAB เพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการหมักนานขึ้น ผลการคัดกรอง LAB ในการศึกษานี้สามารถแยก LAB ได้ค่อนข้างหลากหลายเมื่อเปรียบเทียบกับเครื่องดื่มเตปาเช่แบบดั้งเดิมที่มีวัตถุดิบหลักเป็นเนื้อสับปะรด

3. การคัดกรองและการศึกษาลักษณะเฉพาะของ LAB ในเตปาเช่ สามารถทำได้โดยการสังเกตลักษณะโคโลนีหลังการบ่ม ได้แก่ รูปร่างกลม ขอบเรียบ หรือไม่เรียบ สีครีมหรือสีขาวขุ่น ร่วมกับการยืนยันว่าเป็น LAB โดยใช้การวิเคราะห์เพิ่มเติม ได้แก่ การศึกษาลักษณะโคโลนี การย้อมแกรม การตรวจสอบ catalase test และสัณฐานวิทยาของเซลล์ LAB ที่คัดกรองได้

4. ผลพลอยได้ประเภทชิ้นส่วนผลไม้ชิ้นเล็กที่เกิดขึ้นในกระบวนการผลิตมีเศษผลไม้จากการตัดแต่งที่สถานประกอบการไม่ได้ถูกนำไปใช้ในกระบวนการจัดทำผลิตภัณฑ์อื่นมีศักยภาพเป็นวัตถุดิบผลิตเครื่องดื่มเตปาเช่สูตรเสริมสารต้านอนุมูลอิสระโดยจุลินทรีย์ตามธรรมชาติได้หลากหลาย

5. เครื่องดื่มโปรไบโอติกในตลาดมีแนวโน้มการเติบโตอย่างมาก เนื่องจากกระแสของการรักสุขภาพของกลุ่มคนวัยทำงาน ประกอบกับผู้ผลิตในประเทศยังไม่แพร่หลาย ทำให้ผู้ประกอบการมีโอกาสสูงที่จะใช้งานวิจัยในส่วน of หน่วยวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์มาเป็นแนวทางในการพัฒนาเครื่องดื่มเตปาเช่ที่มีสรรพคุณได้หลากหลายตามคุณสมบัติของวัตถุดิบที่ใช้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้เกิดขึ้นภายใต้ความร่วมมือทางวิชาการของสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ หลักสูตรระดับปริญญาตรีประเภท หลักสูตรปริญญาตรีทางวิชาชีพหรือปฏิบัติการด้วยสหกิจศึกษาบูรณาการกับการทำงาน (Cooperative and Work Integrated Education; CWIE) กับองค์กรร่วมผลิตหลักสูตร ได้แก่ บริษัท กรีนเดลี ฟู้ดส์ จำกัด บริษัท กรีนออร์แกนิก ฟาร์ม จำกัด และบริษัท สหพันธ์ เซ็นจูรี่ จำกัด คณะผู้วิจัยขอขอบคุณฝ่ายผลิต ฝ่ายวิจัยและพัฒนาของสถานประกอบการร่วมผลิตหลักสูตร ที่ให้การ

สนับสนุนด้านวัตถุดิบและข้อมูลที่เกี่ยวข้อง และขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กฤษมาวดี ฐานเจริญ และทีมนักศึกษากลุ่มวิจัยด้านจุลชีววิทยา เป็นอย่างสูง ที่ให้การสนับสนุนข้อมูลอ้างอิงจากงานวิจัยด้านการคัดกรองแบคทีเรียและการวิเคราะห์ด้านจุลชีววิทยาในการศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Aguilar-Uscanga BR, González-Quezada E, Solís-Pacheco JR. Traditional Fermented Beverages in México; 2024.
- Álvarez SA, Rocha-Guzmán NE, Moreno-Jiménez MR, Gallegos-Infante JA, Pérez-Martínez JD, Rosas-Flores W. Functional fermented beverage made with apple, tibicos, and pectic polysaccharides from prickly pear (*Opuntia ficus-indica* L. Mill) peels. *Journal of Food Processing and Preservation* 2021;45(9):e15745.
- Álvarez-Ri, Figueredo-Urbina CJ, Casas A. Physical, chemical, and microbiological characteristics of pulque: Management of a fermented beverage in Michoacán, Mexico. *Foods* 2020;9(3):361.
- de la Fuente-Salcido NM, Castañeda-Ramírez JC, García-Almendárez BE, Bideshi DK, Salcedo-Hernández R, Barboza-Corona JE. Isolation and characterization of bacteriocinogenic lactic bacteria from M-Tuba and Tepache, two traditional fermented beverages in México. *Food science & nutrition* 2015;3(5):434-42.
- Fuente-Salcido NM, Castaneda-Ramírez JC, García-Almendárez DKB, Salcedo-Hernández R, Barbosa-Corona JE. Isolation and characterization of bacteriocinogenic lactic bacteria from M-Tuba and Tepache, two traditional fermented beverages in México. *Food Science and Nutrition* 2015;3:434-42.
- Goyal R, Dhingra H, Bajpai P, Joshi N. Characterization of the *Lactobacillus* isolated from different curd samples. *African Journal of Biotechnology* 2012;11(79):14448-14452.
- Gutiérrez-Sarmiento W, Peña-Ocaña BA, Lam-Gutiérrez A, Guzmán-Albores JM, Jasso-Chávez R, Ruiz-Valdiviezo VM. Microbial community structure, physicochemical characteristics and predictive functionalities of the Mexican tepache fermented beverage. *Microbiological Research* 2022;260: 127045.
- Lara-Hidalgo CE, Hernández-Sánchez H, Hernández-Rodríguez C, Dorantes-Álvarez L. Yeasts in fermented foods and their probiotic potential. *Austin Journal of Nutrition & Metabolism* 2017;4:1045.
- Li S, Liu X, Wang L, Wang K, Li M, Wang X, Wang Z. Innovative beverage creation through symbiotic microbial communities inspired by traditional fermented beverages: Current status, challenges and future directions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2024;64(28):10456-83.
- Oviedo-León JF, Cornejo-Mazón M, Ortiz-Hernández R, Torres-Ramírez N, Hernández-Sánchez H, Castro-Rodríguez DC. Exploration adhesion properties of *Liquorilactobacillus* and *Lentilactobacillus* isolated from two different sources of tepache kefir grains. *Plos one* 2024;19(2):e0297900.
- Ramírez-Guzmán KN, Torres-León C, Martínez-Medina GA, de la Rosa O, Hernández-Almanza A, Alvarez-Perez OB, Aguilar CN. Traditional fermented beverages in Mexico. In *Fermented beverages* Woodhead Publishing; 2019.

- Romero-Luna HE, Peredo-Lovillo A, Dávila-Ortiz G. Tepache: A Pre-Hispanic fermented beverage as a potential source of probiotic yeasts. In *Hispanic Foods: Chemistry of Fermented American* Chemical Society; 2022.
- Sabira QAN, Suryani T. Glucose Levels and Organoleptic Quality Probiotic Tepache of Pineapple Peel on Variation of Sugar and Fermentation Duration. In *Proceeding of International Conference on Biology Education, Natural Science, and Technology* 2023;1:348-55.
- Sukriadi EH, Rustomo WT, Astiana R. Tepache Kulit Nanas. *Jurnal Pariwisata Indonesia* 2020;18(1):28-37.
- Thongprayoon C, Kaewput W, Hatch ST, Bathini T, Sharma K, Wijarnpreecha K, Ungprasert P, D'Costa M, Mao MA, Cheungp-asitporn W. Effects of probiotics on inflammation and uremic toxins among patients on dialysis: a systematic review and meta-analysis. *Digestive Diseases and Sciences* 2019;64:469-79.
- Velázquez-Quñones SE, Moreno-Jiménez MR, Gallegos-Infante JA, González-Laredo RF, Álvarez SA, Rosales-Villarreal MC, Rocha-Guzmán NE. Apple Tepache fermented with tibicos: Changes in chemical profiles, antioxidant activity and inhibition of digestive enzymes. *Journal of Food Processing and Preservation* 2021;45(7):e15597.
- Watcharapoj S, Runchida D. Healthy beverage consumption among aging Thai consumers. *Economics, Management and Sustainability*, 2019;4(2):40-48.
- Whittenbury R. Hydrogen peroxide formation and catalase activity in the lactic acid bacteria. *Microbiology* 1964;35(1):13-26.
- Zellner SR, Gustin DF, Buck JD, Meyers SP. Growth and multiplication of *Rhodotorula glutinis* as determined by viable and total cell counts. *Antonie van Leeuwenhoek* 1963;29:203-210.