การประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและพฤกษเคมีของเครื่องดื่มคอมบูชาดอกดาวเรืองผสมผลไม้

EVALUATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY AND PHYTOCHEMICALS EFFECTS OF FRUIT-INFUSED *TAGETES ERECTA* KOMBUCHA BEVERAGE

วนัชพร เลื่อนลอย ทัศนีย์ เที่ยงเกตุ และกาญจนา วงศ์กระจ่าง*

Wanatporn Luenloi, Thatsanee Thiangket and Kanjana Wongkrajang*

บทคัดย่อ

คอมบูชาเป็นเครื่องดื่มที่มีสารต้านอนุมูลอิสระสูง มีโปรไบโอติก วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาสูตรคอมบูชาดอกดาวเรือง ประเมินลักษณะกายภาพเบื้องต้น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS Assay และสารพฤกษเคมี (phenolic content และ flavonoid content) ของคอมบูชาดอกดาวเรืองสูตรต่าง ๆ ที่มีส่วนผสมแตกต่างกัน ดังนี้ สูตรผสมหญ้าหวาน สูตรผสมผลไม้ สูตรชาสมุนไพร ผลการทดลองพบว่าคอมบูชามีสีอ่อนกว่าเมื่อเทียบกับสีของชาก่อนหมัก มีรสเปรี้ยว ค่า pH 3.0-3.5 การเปรียบเทียบคอมบูชาดอกดาวเรืองทั้งหมด 10 สูตร โดยเปรียบเทียบระหว่างสูตรมีหญ้าหวานกับไม่มีหญ้าหวาน สูตรผสมผลไม้ต่างกัน 5 ชนิด และสูตรดอกดาวเรืองกับชาชนิดอื่น 3 ชนิด พบว่าผลการประเมินการยับยั้งอนุมูลอิสระของคอมบูชาดอกสูตรที่มีหญ้าหวานแสดงฤทธิ์ที่ดีกว่าไม่มีหญ้าหวาน โดยคอมบูชาที่เจือจาง 1 เท่า (50%) แสดงผลใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน Trolox 0.5 mg/ml และเปรียบเทียบสูตรคอมบูชาดอกดาวเรืองผสมผลไม้พบว่าสูตรที่ผสมกล้วยหอมดีที่สุด นอกจากนี้ได้ประเมินสูตรชาสมุนไพรอื่น ๆ เทียบกับชาดอกดาวเรือง พบว่าชาใบมะม่วงดีที่สุดและดีกว่าดอกดาวเรือง สำหรับผลวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์รวมเป็นไปทิศทางเดียวกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000

Faculty of Science and Technology, Pibulsongkram Rajabhat University, Muang District, Phitsanulok Province 65000

*Corresponding author e-mail: kanjana_w@psru.ac.th

Received: 20 February 2024; Revised: 27 May 2024; Accepted: 30 May 2024

DOI: https://doi.org/10.14456/lsej.2024.16

จากผลการทดลองทั้งหมดสรุปได้ว่าคอมบูชาสูตรชาใบมะม่วงผสมหญ้าหวานผสมกล้วยหอมเป็นสูตรที่ดีที่สุด และดีรองลงมาคือคอมบูชาสูตรชาดอกดาวเรืองผสมหญ้าหวานผสมกล้วยหอม นำไปสู่การสร้างผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มเพื่อสุขภาพเพื่อเพิ่มโปรไบโอติกและสามารถต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ได้ เช่น ทำเป็นผงใช้เป็นส่วนผสมของเครื่องดื่มและเบเกอรี

คำสำคัญ: คอมบูชา ดาวเรือง สารต้านอนุมูลอิสระ ฟีนอลิก ผลไม้

Abstract

Kombucha is a drink that is rich in antioxidants and contains probiotics. The objective of this research is to study the kombucha Marigold formula, evaluate primary physical characteristics and Antioxidant effects using ABTS Assay as well as phytochemicals (phenolic content and flavonoid content) of various kombucha marigold formulas with different ingredients as follows Stevia formula, fruit formula, herbal tea formula. The results showed that the kombucha was light in color compared to the color of the tea before fermentation and had a sour taste pH of 3.0-3.5. Comparison of a total of 10 marigold kombucha recipes, comparing stevia and no stevia recipes, formulations mixed with five different types of fruits and marigold recipes with three other types of tea, it was found that the results of the evaluation of free radical inhibition of kombucha flower recipes with stevia showed better effects than none-Stevia, by kombucha diluted 1-fold (50%), showed a similar effect to the standard substance Trolox 0.5 mg/ml and compared the marigold flower mixed fruit formula and found that the formula mixed with bananas showed the best result. In addition, other herbal tea recipes were evaluated compared with marigold tea. It was found that mango leaf tea is the best and better than marigold. The results of analyzing the total phenolics and flavonoids content, in the same direction as those of an antioxidant effect. In summary, the kombucha recipe for mango leaf tea mixed with stevia and bananas is the best recipe, the next is kombucha recipe of marigold tea mixed with stevia and bananas. The studies can further develop healthy beverage products, enhanced probiotics, and other products such as, making into powder as an ingredient beverage and bakery.

Keywords: Kombucha, *Tagetes erecta* L., Antioxidants, Phenolic, Fruit

บทนำ

ปัจจุบันผู้บริโภคต้องการผลิตภัณฑ์ที่ช่วยเสริมสร้างสุขภาพที่ดี คอมบูชา (Kombucha) เป็นผลิตภัณฑ์ทางเลือกเพื่อสุขภาพที่น่าสนใจ คอมบูชาเป็นชาหมักที่มีมานานมากกว่า 2,000 ปี ดีต่อสุขภาพในแง่ของเพิ่มภูมิคุ้มกันของร่างกายเนื่องจากมีโปรไบโอติก มีสารต้านอนุมูลอิสระในปริมาณที่สูง (Karolina et al, 2020) แสดงฤทธิ์เกี่ยวข้องกับโรคเบาหวานโดยลดระดับน้ำตาลในเลือด (Hardoko et al, 2020) คอมบูชาเกิดจากการหมักชากับน้ำตาลด้วยจุลินทรีย์ที่ทำงานร่วมกันระหว่างยีสต์และแบคทีเรียกรดอะซิติกหรือเรียกว่า SCOBY (Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast) โดยยีสต์จะทำหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ (Soto et al, 2018) ซึ่งจะกระตุ้นการเจริญเติบโตของแบคทีเรียกรดอะซิติกที่จะใช้แอลกอฮอล์เปลี่ยนเป็นกรดอะซิติก (Blanc, 1996) กรดกลูคูโรนิก (Glucuronic acid) และ DSL (D-saccharic acid-1,4-lactone) จากผลวิจัยที่เคยรายงานพบว่าคอมบูชามีสารที่มีประโยชน์ต่อร่างกายหลายชนิด เช่น polyphenol, gluconic acid, glucuronic acid, lactic acid, vitamins, amino acid และ antibiotics (Ames et al, 1993) สารต้านอนุมูลอิสระ ลดอาการโรคข้ออักเสบและช่วยการทำงานของไต เป็นต้น (Bhattacharya et al, 2013) คอมบูชาในการหมักส่วนผสมดั้งเดิมของคือชา (ชาดำ ชาเขียว และชาอู่หลง) โดยเฉพาะคอมบูชาชาเขียวแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี (Ibrahim et al, 2019) สำหรับคอมบูชาดอกดาวเรืองมีการนำมาทดลองบางส่วน งานวิจัยมีน้อยมาก การนำส่วนกลีบดอกดาวเรืองมาใช้แทนวัตถุดิบดั้งเดิมของการหมักคอมบูชาและเพิ่มความหวานของคอมบูชาด้วยหญ้าหวานทำให้สามารถลดปริมาณน้ำตาลส่งผลให้ลดความเสี่ยงในการเกิดโรคเบาหวาน การเลือกกลีบดอกดาวเรืองนำมาศึกษา เนื่องจากมีสาร Quercetagetin glycoside เป็นสารที่จัดอยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดี ซึ่งพบว่าในดอกดาวเรืองเป็นสารหลักที่มีปริมาณมากถ้าสกัดด้วย 40% เอทานอล หรือเทียบเท่าสุรา 40 ดีกรี (Isantea & Wongkrajang, 2016)

ดาวเรือง (Marigold) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Tagetes erecta L.* เป็นพืชเศรษฐกิจ ปลูกเพื่อเป็นไม้ตัดดอกและดอกสามารถแปรรูปเป็นชาเสริมสุขภาพเป็นแหล่งสำคัญของสารที่มีคุณสมบัติเป็นสารต่อต้านอนุมูลอิสระ (Priyanka et al, 2013) มีสาร Quercetagetin glycoside เป็นสารที่จัดอยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดี หญ้าหวาน มีสาร Stevioside ที่ให้ความหวานคล้ายน้ำตาลทราย มีความหวานประมาณ 300 เท่าของน้ำตาลซูโครส เป็นสารที่มีแคลอรีต่ำมาก (Brandle & Rosa, 1992)

คอมบูชาส่วนผสมดั้งเดิมคือชา (ชาดำ ชาเขียว และชาอู่หลง) และดอกดาวเรืองเป็นดอกไม้รับประทานได้นำมาทำชามีสารกลุ่มฟลาโวนอยด์เป็นสารออกฤทธิ์ทำให้มีความสนใจในการเลือกใช้ดอกดาวเรืองเป็นวัตถุดิบทดแทนชาช่วยเพิ่มความหลากหลายของผลิตภัณฑ์คอมบูชา และมีการนำเอาดอกดาวเรืองมาทำเป็นคอมบูชาน้อยมาก นอกจากนี้ยังไม่มีผลิตภัณฑ์คอมบูชาดอกดาวเรืองออกมาขายและแทบจะไม่มีงานวิจัยเกี่ยวกับคอมบูชาดอกดาวเรือง ดังนั้นผู้วิจัยมีความสนใจที่จะศึกษาสูตรคอมบูชาที่มี

ส่วนผสมต่างกันทั้งหมด 10 สูตร โดยเปรียบเทียบสูตรชาดอกดาวเรืองที่มีส่วนผสมหญ้าหวานและไม่มีหญ้าหวาน (เพื่อเพิ่มรสหวานแทนน้ำตาลและมีสารต้านอนุมูลอิสระ) และมีส่วนผสมผลไม้ที่แตกต่างกัน โดยเลือกที่เพิ่มรสชาติที่แตกต่างกัน สี ที่สามารถนำมาทำคอมบูชาได้ตลอดปี โดยเลือกกล้วยหอม และผลไม้แช่แข็ง (มิกซ์เบอร์รี มัลเบอร์รี และ สตรอว์เบอร์รี) นอกจากนี้เปรียบเทียบชนิดของชาที่แตกต่างกัน (ปลีกล้วย ลูกน้ำนม และใบมะม่วงน้ำดอกไม้) เปรียบเทียบกับชาดอกดาวเรือง โดยจะประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของคอมบูชาสมุนไพร ปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ของแต่ละสูตรเพื่อเลือกสูตรที่ดีของเครื่องดื่มเพิ่มโปรไบโอติกและสามารถนำข้อมูลไปต่อยอดในการพัฒนาผลิตภัณฑ์คอมบูชาในรูปแบบต่าง ๆ ต่อไป เช่น คอมบูชารูปแบบเจลลี แบบผง เพื่อนำเป็นส่วนผสมเครื่องดื่มหรือเบเกอรี

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมตัวอย่างคอมบูชา

กระบวนการหมักคอมบูชาโดยใช้วิธีดัดแปลงจากงานวิจัยของทัศนีย์ เที่ยงเกตุ (Thiangket et al, 2022) การเตรียมหัวเชื้อได้จากการหมักสับปะรดกับน้ำตาลทราย 10% หมักเป็นเวลา ประมาณ 1 เดือนมีค่า pH ประมาณ 3 เริ่มมีแผนเซลลูโลสเกิดขึ้นบนผิว เรียกว่า SCOBY (Symbiotic culture of bacteria and yeast) สามารถนำไปหมักคอมบูชาได้ ถ้าต้องการหมักคอมบูชาปริมาณ 1 ลิตร ชั่งชาจำนวน 5 กรัม (ชาดอกดาวเรือง ซื้อจากวิสาหกิจชุมชนดาวเรืองภูเรือ จังหวัดเลย) เติมน้ำ จำนวน 500 มิลลิลิตร ใส่เครื่องไมโครเวฟ ปรับที่อุณหภูมิ 350 วัตต์ 4 นาที (90 องศาเซลเซียส) พักให้อุ่น (15 นาที) แล้วแช่ต่อที่เป็นเวลา 15 นาที (อุณหภูมิห้อง) เอาถุงชาออก กรณีสูตรที่มีใบหญ้าหวาน ให้เพิ่มหญ้าหวาน 1 กรัม ชงพร้อมกับชา จากนั้นนำชาที่ได้ใส่โหลที่เตรียมไว้ เติมน้ำตาลทรายแดง จำนวน 80 กรัม แล้วเติมหัวเชื้อ SCOBY จำนวน 50 กรัม เติมน้ำต้มสุกเย็นให้ครบ 1 ลิตร คนให้เข้ากัน ปิดฝาโหลด้วยผ้าขาวบางหรือกระดาษทิชชู หมักเป็นเวลา 14 วัน (Ibrahim et al, 2019; Zhen et al, 2018) ได้คอมบูชาครั้งที่ 1 (F1) สำหรับสูตรที่มีผลไม้ มีการหมักต่ออีก 5 วัน นำผลไม้ปั่นหยาบ 100 กรัม ได้คอมบูชาครั้งที่ 2 (F2) ได้ตัวอย่างสูตรคอมบูชา 10 สูตร สูตร 1=ชาดอกดาวเรือง (TE(P)-Tea); 2=คอมบูชาดอกดาวเรือง (TE(P)-F1); 3=คอมบูชาดอกดาวเรืองหญ้าหวาน (TE(P)+SR-F1); 4=คอมบูชาดอกดาวเรืองหญ้าหวาน+กล้วยหอม (TE(P)+SR+B-F2); 5=คอมบูชาดาวเรืองหญ้าหวาน+มิกซ์เบอร์รี (TE(P)+SR+Mix-F2); 6=คอมบูชาดาวเรืองหญ้าหวาน+มัลเบอร์รี (TE(P)+SR+Mul-F2); 7=คอมบูชาดอกดาวเรืองหญ้าหวาน+สตรอว์เบอร์รี (TE(P)+SR+Straw-F2); 8=คอมบูชาปลีกล้วยหญ้าหวาน+กล้วยหอม (BF(F)+SR+B-F2); 9=คอมบูชาลูกน้ำนมหญ้าหวาน+กล้วยหอม (CC(Fr)+SR+B-F2); และ 10=คอมบูชาใบมะม่วงหญ้าหวาน+กล้วยหอม (MI(L)+SR+B-F2)

หมายเหตุ TE(P)=กลีบดอกดาวเรือง , BF(F)=ปลีกล้วยน้ำว้า, CC(Fr)=ลูกน้ำนม, MI(L)=ใบมะม่วง, SR=หญ้าหวาน, B=กล้อยหอม, Mix=มิกซ์เบอร์รี, Mul=มัลเบอร์รี, Straw=สตรอว์เบอร์รี

การตรวจสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างคอมบูชา การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay โดยใช้วิธีดัดแปลงจาก Braca (Braca et al., 2002) โดยนำสารตัวอย่างคอมบูชาจำนวน 10 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลุมและเติมสารละลาย 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) ความเข้มข้น 1.26 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มไว้เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader (SPECTRO star Nano, BMG LabTech) คำนวณร้อยละการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระโดยเทียบกับตัวควบคุมเชิงลบ (control) และ Trolox เป็นตัวควบคุมเชิงบวก

จากสูตร

$$\% \text{ ABTS radical inhibition} = [A_{control} - A_{sample} / A_{control}] \times 100$$

เมื่อ $A_{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย ABTS ที่ไม่มีสารทดสอบ

A_{sample} คือ ค่าสารดูดกลืนแสงของสารละลาย ABTS ที่มีสารทดสอบ (ตัวอย่างคอมบูชา)

การวิเคราะห์หาปริมาณสารฟีนอลิกรวมของตัวอย่างคอมบูชา การทดลองเพื่อหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมของคอมบูชา ดัดแปลงจากวิธีของ Srisook et al. (2010) โดยเตรียมสารตัวอย่างเติมลงใน 96 well plate จำนวน 6.25 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่น 106.25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมสารละลาย Folin-Ciocaltue จำนวน 12.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้นร้อยละ 7 โดยมวลต่อปริมาตร (7% w/v) จำนวน 125 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader (SPECTRO star Nano, BMG LabTech) คำนวณหาปริมาณสารฟีนอลิกรวมด้วยกราฟมาตรฐานกรดแกลลิกความเข้มข้น 25, 50, 75, 100, 125 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ละสูตรมีการทำการทดลองซ้ำจำนวน 3 ครั้ง

วิเคราะห์หาปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมของตัวอย่างคอมบูชา การทดลองเพื่อหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวมของคอมบูชาดัดแปลงจากวิธีของ Wattanakul et al. (2010) โดยเตรียมสารตัวอย่างเติมลงใน 96 well plat ปริมาณรวม 200 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่น 35 ไมโครลิตร และสารละลายโซเดียมไนไตรท์ ($NaNO_2$) เข้มข้นร้อยละ 5 โดยมวลต่อปริมาตร (5%w/v) ปริมาตร 7.5 ไมโครลิตร เติมสารละลายอะลูมิเนียมไตรคลอไรด์ ($AlCl_3$) เข้มข้นร้อยละ 10 โดยมวลต่อปริมาตร (10%w/v) จำนวน 7.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader (SPECTRO star Nano, BMG LabTech) คำนวณหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์รวมด้วยกราฟมาตรฐานสายละลายรูตินในเอทานอลความเข้มข้น 10, 50, 100, 150, 200 และ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one way ANOVA) ค่าถูกแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของ 3 ซ้ำ ของการทดลอง และได้รับผลพิจารณาอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

ผลการวิจัย

การศึกษาสูตรการหมักคอมบูชาแบ่งการศึกษา 3 ส่วนดังนี้ 1) การเปรียบเทียบผลของการเพิ่มส่วนผสมหญ้าหวาน 2) การเปรียบเทียบผลของการเพิ่มส่วนผสมผลไม้โดยเลือกผลไม้ที่หาได้ง่ายและมีทั้งปีจึงเลือกผลไม้แช่แข็ง 3) การเปรียบเทียบที่มีส่วนผสมผลไม้ที่ดีที่สุดกับชนิดชาที่แตกต่าง การเตรียมตัวอย่างมีการหมัก 2 ขั้นตอน โดยขั้นตอนที่ 1 หมัก 14 วัน ไม่มีส่วนของผลไม้ (F1) ขั้นตอนที่ 2 หมักต่อจาก F1 อีก 5 วัน มีผลไม้ (F2) ได้ตัวอย่างสูตรคอมบูชา 10 สูตร สูตร 1=ชาดอกดาวเรือง (TE(P)-Tea); 2=คอมบูชาดอกดาวเรือง (TE(P)-F1); 3=คอมบูชาดอกดาวเรืองหญ้าหวาน (TE(P)+SR-F1); 4=คอมบูชาดอกดาวเรืองหญ้าหวาน+กล้วยหอม (TE(P)+SR+B-F2); 5=คอมบูชาดาวเรืองหญ้าหวาน+มิกซ์เบอร์รี (TE(P)+SR+Mix-F2); 6=คอมบูชาดาวเรืองหญ้าหวาน+มัลเบอร์รี (TE(P)+SR+Mul-F2); 7=คอมบูชาดอกดาวเรืองหญ้าหวาน+สตรอว์เบอร์รี (TE(P)+SR+Straw-F2); 8=คอมบูชาปลีกล้วยหญ้าหวาน+กล้วยหอม (BF(F)+SR+B-F2); 9=คอมบูชาลูกน้ำนมหญ้าหวาน+กล้วยหอม (CC(Fr)+SR+B-F2); และ 10=คอมบูชาใบมะม่วงหญ้าหวาน+กล้วยหอม (MI(L)+SR+B-F2) แสดงดังภาพที่ 1 (Figure 1)

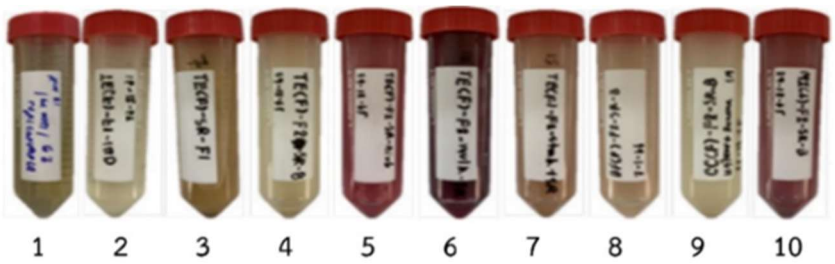

Figure 1 Kombucha Formula 1) TE(P)-Tea; 2) TE(P)-F1; 3) TE(P)+SR-F1; 4) TE(P)+SR+B-F2; 5) TE(P)+SR+Mix-F2; 6) TE(P)+SR+Mul-F2; 7) TE(P)+SR+Straw-F2; 8) BF(F)+SR+B-F2; 9) CC(Fr)+SR+B-F2 and 10) MI(L)+SR+B-F2

การศึกษาผลการยับยั้งอนุมูลอิสระของคอมบูชาดอกดาวเรืองหญ้าหวาน

1. การเปรียบเทียบผลของการเพิ่มส่วนผสมหญ้าหวานในคอมบูชาดอกดาวเรือง

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS radical scavenging ของคอมบูชาที่หมัก 14 วัน เปรียบเทียบคอมบูชาดอกดาวเรือง [TE(P)-F1] และคอมบูชาดอกดาวเรืองหญ้าหวาน [TE(P)+SR-F1] โดยศึกษา 3 ความเข้มข้น เจือจางจากสูตร (X) ดังนี้ 50% (X/2), 25% (X/4) และ 12.5% (X/8) ตามลำดับ ผลการทดสอบพบว่าคอมบูชาดอกดาวเรืองหญ้าหวานที่เจือจาง 25% (X/4) แสดงผลเทียบเท่ากับคอมบูชาดอกดาวเรืองที่เจือจาง 50% (X/2) ดังนั้นสรุปได้การเพิ่มหญ้าหวานสามารถเพิ่มฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระได้และดีกว่าไม่มีหญ้าหวานประมาณ 2 เท่า นอกจากนี้พบว่าคอมบูชาดอกดาวเรืองหญ้าหวานที่เจือจาง 50% (X/2) แสดงฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีใกล้เคียงสารมาตรฐาน Trolox ความเข้มข้น 0.5 mg/ml แสดงการเปรียบเทียบดังกราฟในภาพที่ 2 (Figure 2)

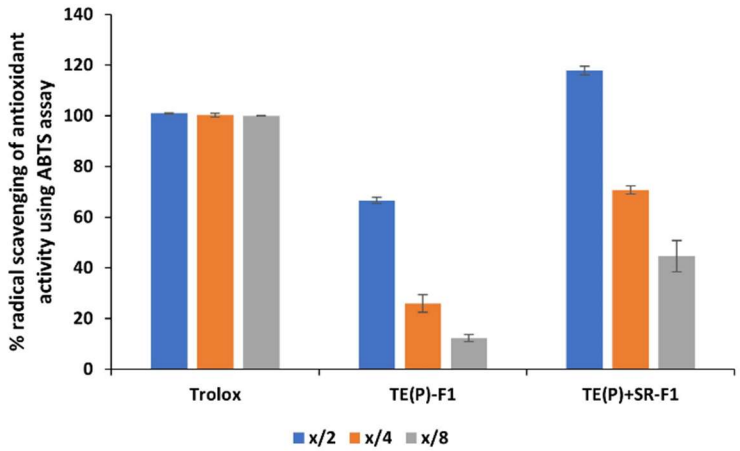

Figure 2 Comparative results of free radical scavenging activity of marigold kombucha [TE(P)-F1] and marigold kombucha stevia [TE(P)+SR-F1] compared to the standard substance Trolox; x/2 = Dilute 1 times the amount of kombucha; x/4=Dilute 2 times the amount of kombucha and x/8=Dilute 4 times the amount of kombucha, $p<0.05$ (n=3)

2. การเปรียบเทียบผลของการเพิ่มส่วนผสมผลไม้ในคอมบูชาดอกดาวเรืองหญ้าหวาน

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS radical scavenging ของคอมบูชาดอกดาวเรืองผสมผลไม้ ดังนี้ กล้วยหอม (B) มิกซ์เบอร์รี (Mix) มัลเบอร์รี (Mul) และสตรอว์เบอร์รี (Straw) โดยเปรียบเทียบ 3 ความเข้มข้น มีดังนี้ คอมบูชาเจือจาง 50% 25% และ 12.5% ตามลำดับ ผลการทดสอบยับยั้งอนุมูลอิสระ พบว่าคอมบูชาดอกดาวเรืองทีมีส่วนผสมผลไม้แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นทุกชนิด ชนิดที่ดีที่สุดใกล้เคียงกันคือ กล้วยหอม กับ มัลเบอร์รี พบว่าคอมบูชาดอกดาวเรืองที่มี

หญ้าหวานที่เจืออจาง 8 เท่า แสดงฤทธิ์ที่ดีกว่าประมาณ 3 เท่า แต่ผลดีน้อยกว่าสารมาตรฐาน Trolox ความเข้มข้น 0.5 mg/ml ประมาณ 2 เท่า แสดงการเปรียบเทียบดังกราฟในภาพที่ 3 (Figure 3)

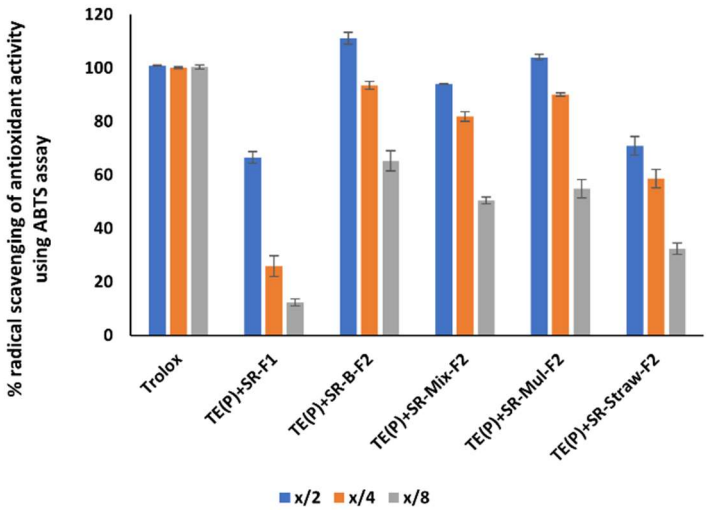

Figure 3 Comparative effect of free radical scavenging activity of kombucha, marigold and stevia mixed with fruit. [TE(P)+SR+Fruit-F2] Fruit as follows. B=banana Mix=mixed berry Mul=Mulberry Straw=Strawberry Compared to standard Trolox (0.5 mg/ml); x/2 = percentage concentration of sample is 50%; x/4 = percentage concentration of sample is 25% and x/8 = percentage concentration of sample is 12.5%, $p<0.05$ (n=3)

3. การเปรียบเทียบผลของหญ้าหวานและผลไม้ชนิดเดียวกันในคอมบูชาต่างกัน

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS Assay ของคอมบูชาหญ้าหวานผสมผลไม้ พบว่ากล้วยหอมดีที่สุด จึงสนใจเปรียบเทียบคอมบูชาที่มีชนิดชาสมุนไพรต่างกันกับดอกดาวเรือง โดยตัวอย่างคอมบูชาเป็นการหมักที่มีส่วนผสมหญ้าหวานและกล้วยหอมเหมือนกัน มีตัวอย่างชาสมุนไพรดังนี้ ดอกดาวเรือง TE(P) ปลีกล้วย BF(F) ลูกน้ำนม CC(F) และ ใบมะม่วงน้ำดอกไม้ MI(L) ซึ่งชาได้จากส่วนของสมุนไพรที่แตกต่างกัน เช่น ดอก ปลี ผล และ ใบ โดยเปรียบเทียบ 3 ความเข้มข้น มีดังนี้ คอมบูชาเจืออจาง 50% (X/2), 25% (X/4) และ 12.5% (X/8) ตามลำดับ ผลการทดสอบ พบว่าคอมบูชาใบมะม่วงหญ้าหวานผสมกล้วยหอมแสดงฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระที่ดีที่สุด ที่ความเข้มข้นเจืออจาง 8 เท่า (x/8) แสดงฤทธิ์ที่ดีกว่าชาดอกดาวเรืองมากกว่า 2 เท่า และผลดีเทียบเท่าสารมาตรฐาน Trolox ความเข้มข้น 0.5 mg/ml แสดงการเปรียบเทียบดังกราฟในภาพที่ 4 (Figure 4)

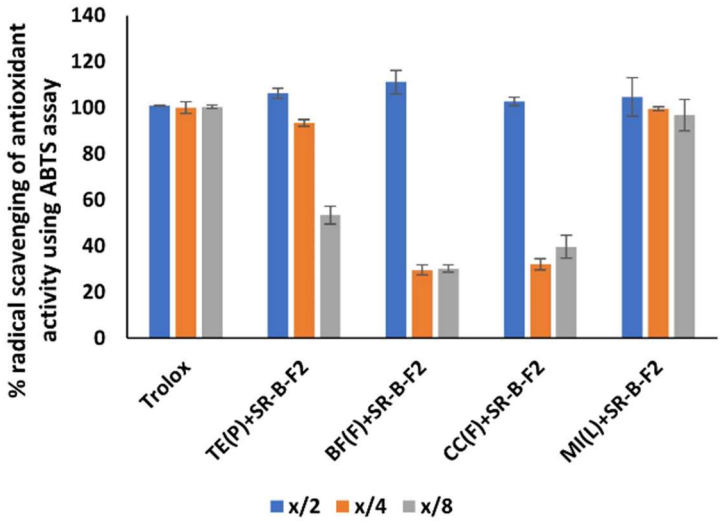

Figure 4 Comparative effect of free radical scavenging activity of kombucha, stevia herbal tea mixed with banana. (Herb+SR+B-F) Herbs as follows; TE(P)=Marigold BF(F)=banana blossom CC(F)=star apple MI(L)=Mango leaves Compared to standard Trolox (0.5 mg/ml); x/2 percentage concentration of sample is 50%; x/4 = percentage concentration of sample is 25% and x/8 = percentage concentration of sample is 12.5%, $p<0.05$ (n=3)

4. การวิเคราะห์ปริมาณพฤกษเคมีของคอมบูชาดอกดาวเรืองสูตรต่าง ๆ

4.1 การเปรียบเทียบผลปริมาณสารฟีนอลิกรวมและสารฟลาโวนอยด์รวมของคอมบูชาดอกดาวเรืองกับคอมบูชาดอกดาวเรืองหญ้าหวาน

การวิเคราะห์ปริมาณพฤกษเคมีของคอมบูชาดอกดาวเรืองมีสาร 2 กลุ่ม กลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ ผลการวิเคราะห์ พบว่าคอมบูชาดอกดาวเรืองที่มีส่วนผสมหญ้าหวานมีปริมาณฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวมที่ดีกว่าไม่มี โดยมีฟีนอลิกรวมปริมาณมากกว่า 2 เท่า มีฟลาโวนอยด์รวมปริมาณมากกว่า 18 เท่า แสดงการเปรียบเทียบดังกราฟดังภาพที่ 5 (Figure 5)

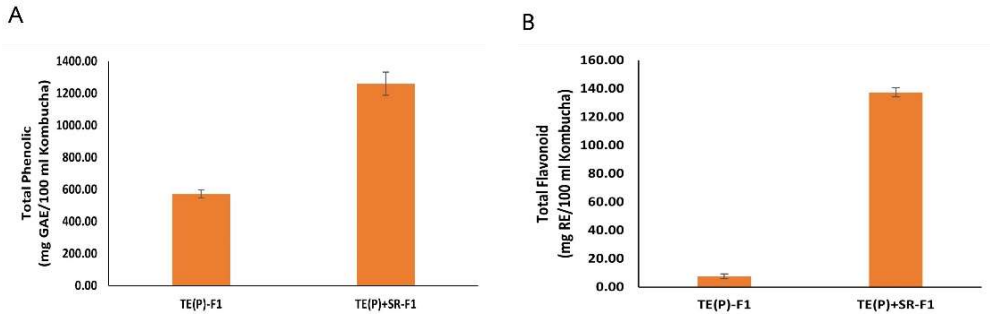

Figure 5 Comparative results of total phenolic content A) and total flavonoid content of marigold kombucha with stevia and without; TE(P)-F1 = Marigold kombucha without stevia TE(P)+SR-F1=Marigold Kombucha with Stevia, (A) total phenolic content and total B) flavonoid content, $p<0.05$ (n=3)

4.2 การเปรียบเทียบผลปริมาณสารฟีนอลิกรวมและสารฟลาโวนอยด์รวมของคอมบูชาดอกดาวเรืองผสมผลไม้

การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวมของคอมบูชาดอกดาวเรืองหญ้าหวานผสมผลไม้ ผลการวิเคราะห์ พบว่าสูตรผสมกล้วยหอมมีปริมาณฟีนอลิกรวมปริมาณมากที่สุด แต่ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมมากที่สุดเป็นสูตรที่สตรอว์เบอร์รี แสดงการเปรียบเทียบดังกราฟในภาพที่ 6 (Figure 6)

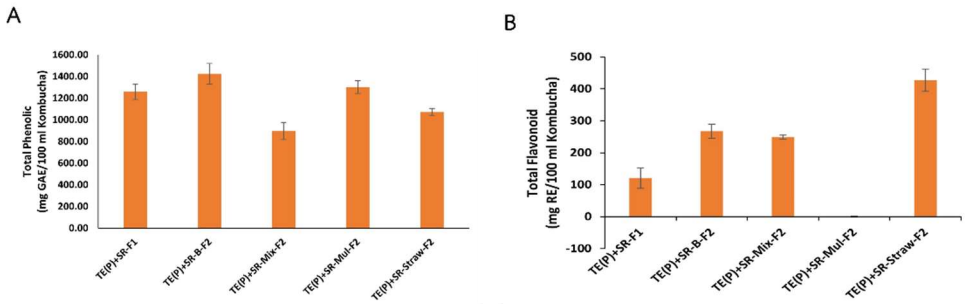

Figure 6 Comparative results of total phenolic content and total flavonoid content of marigold kombucha with fruit (TE(P)+SR+Fruit-F) as follows=Banana Mix=Mixberry Mul=Mulberry Straw=Strawberry A) total phenolic content B) total flavonoid content, $p<0.05$ (n=3)

4.3 การเปรียบเทียบผลปริมาณสารฟีนอลิกรวมและสารฟลาโวนอยด์รวมของคอมบูชาสมุนไพรหญ้าหวานผสมกล้วยหอม

จากผลของสูตรผลไม้กล้วยหอมมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงที่สุด จึงวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวมและฟลาโวนอยด์รวมของคอมบูชาสมุนไพรหญ้าหวานผสมกล้วยหอมเทียบกับคอมบูชาดอกดาวเรืองหญ้าหวาน+กล้วยหอม ผลการวิเคราะห์พบว่าสูตรดอกดาวเรืองหญ้าหวาน+กล้วยหอมมีปริมาณฟีนอลิกรวมมากที่สุด และปริมาณฟลาโวนอยด์รวมมากที่สุดเป็นสูตรดอกดาวเรืองหญ้าหวาน+กล้วยหอมและใบมะม่วงหญ้าหวาน+กล้วยหอม แสดงการเปรียบเทียบดังกราฟใน ภาพที่ 7 (Figure 7)

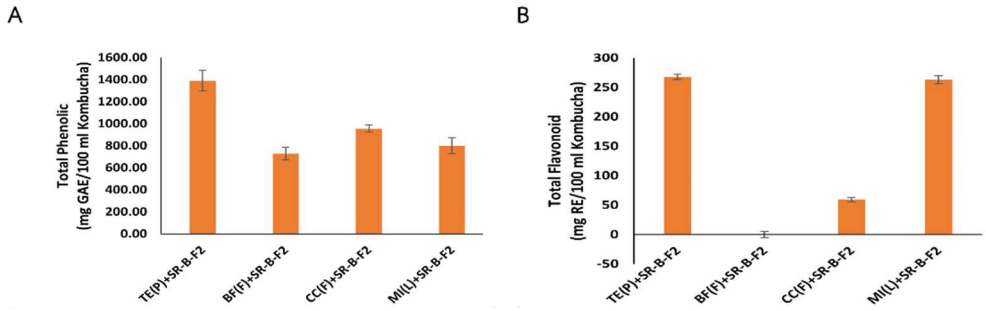

Figure 7 Comparative results of total phenolic content and total flavonoid content of stevia herbal kombucha mixed with banana; herbal tea as follows: TE(P)=Marigold flower; BF(F)=banana blossom CC(F)=Star apple fruit; MI(L)=Mango leaves, (A) total phenolic content (B) total flavonoid content, $p<0.05$ (n=3)

อภิปรายผล

คอมบูชาเป็นเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพมีรสเปรี้ยว มีความซ่า ได้จากกระบวนการหมักโดยยีสต์และแบคทีเรียกรดอะซิติก นิยมหมักด้วยชาดำ ชาเขียว และชาอู่หลง งานวิจัยนี้สนใจนำชาดอกดาวเรืองนำมาหมักแทนชา วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ เพื่อศึกษาสูตรของคอมบูชาที่ของชาดอกดาวเรืองโดยประเมินลักษณะทางกายภาพ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และสารพฤกษเคมีของคอมบูชาดอกดาวเรืองสูตรต่าง ๆ โดยมีส่วนผสมแตกต่างกัน แบ่งเป็นหัวข้อดังนี้ 1) เปรียบเทียบคอมบูชาดาวเรืองผสมหญ้าหวานกับไม่มี 2) เปรียบเทียบคอมบูชาดาวเรืองผสมผลไม้ต่างชนิดกัน 3) เปรียบเทียบคอมบูชาชาสมุนไพรต่างชนิดผสมผลไม้ชนิดเดียวกัน โดยกระบวนการหมักมีปริมาณน้ำตาล 80 กรัมต่อลิตร และปริมาณ SCOBY 50 กรัม ต่อลิตร ควบคุมการหมัก 14 วัน (F1) อ้างอิงจากงานวิจัยของ Zhen et al. (2018) และเพิ่มผลไม้แล้วหมักต่ออีก 5 วัน (F2) ผลการทดลองพบว่า คอมบูชามีสีอ่อนลงเมื่อเทียบกับสีของชาก่อนหมัก มีรสเปรี้ยวขึ้น ค่า pH 3-3.5 เป็นไปทิศทางเดียวกับงานวิจัยของ Majid et al (2023) ผลการประเมินการยับยั้งอนุมูลอิสระ พบว่าคอมบูชาดอกดาวเรืองที่มีหญ้าหวานแสดงฤทธิ์ที่ดีกว่าไม่มี

ประมาณ 2 เท่า โดยคอมบูชาดอกดาวเรืองที่มีหญ้าหวานเจือจางเหลือความเข้มข้นดังนี้ 50% (X/2), 25% (X/4) และ 12.5% (X/8) แสดงฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 117.87% 70.65% และ 44.62% ตามลำดับ จากผลการทดลองแปลผันตามปริมาณปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ ดังผลแสดงในภาพที่ 5 (Figure 5) ซึ่งสูตรคอมบูชาดอกดาวเรืองที่มีหญ้าหวานเป็นส่วนผสมมีปริมาณที่สูงกว่าสูตรไม่มีหญ้าหวาน ผลที่ได้เป็นไปในทิศทางเดียวกับข้อมูลของงานวิจัยที่พบว่าในหญ้าหวานมีสารฟีนอลิกที่สูง 142.21±0.01 ไมโครกรัมของกรดแกลลิคต่อมิลลิลิตร (Phakamus, 2018) และได้สนใจศึกษาต่อโดยต้องการต่อยอดสูตรที่ได้ คือสูตรคอมบูชาที่มีหญ้าหวานเป็นส่วนผสมโดยได้ทำการทดลองสูตรคอมบูชาดอกดาวเรืองหญ้าหวานมีการเพิ่มส่วนผสมของผลไม้เพื่อเพิ่มกลิ่น รสชาติ สีสัน จะส่งผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระหรือไม่ สำหรับผลไม้ที่เลือกเป็นผลไม้แช่แข็งและหาง่าย เนื่องจากต้องการให้มีตลอดปี และมีสีสวย ผลไม้ที่เลือกเป็นส่วนผสมมีดังนี้ กล้วยหอม มิกซ์เบอร์รี มัลเบอร์รี และสตรอว์เบอร์รี โดยเปรียบเทียบกับสูตรที่ไม่ได้ใส่ผสมไม้ มีการเปรียบเทียบทั้งหมด 5 สูตร พบว่าสูตรที่มีผลไม้ดีกว่าไม่มี ผลการทดลองพบว่านำคอมบูชาทั้ง 5 สูตร นำมาเจือจางด้วยน้ำ 1 เท่า (X/2) คอมบูชาสูตรไม่มีผลไม้ แสดงฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระได้ ประมาณร้อยละ 65 ในขณะที่คอมบูชาสูตรที่มีส่วนผสมกล้วยหอม มิกซ์เบอร์รี และ มัลเบอร์รี แสดงฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระได้มากกว่าร้อยละ 80 และสูตรที่มีส่วนผสมกล้วยหอมเป็นสูตรที่ดีที่สุดเมื่อเจือจาง ความเข้มข้นดังนี้ 50% (X/2), 25% (X/4) และ 12.5% (X/8) โดยแสดงฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 111.13% 93.50% และ 65.25% ตามลำดับ และมีส่วนผสมของมัลเบอร์รีเป็นสูตรที่ดีรองลงมา ผลแสดงในภาพที่ 3 (Figure 3) ซึ่งผลการทดลองแปรผันตามปริมาณปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ พบว่าสูตรที่มีกล้วยหอมเป็นส่วนผสมมีปริมาณฟีนอลิกที่สูง ในขณะ ฟลาโวนอยที่สูงที่สุดพบในสูตรคอมบูชาที่มีส่วนผสมสตรอว์เบอร์รีแสดงว่าฟีนอนิกแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าฟลาโวนอยด์ภาพที่ 6 (Figure 6) พบว่าคอมบูชาที่มีกล้วยหอมเป็นส่วนผสมผลการทดลองเป็นไปในทิศทางเดียวกับงานวิจัยของ Urrutia et al. (2021)

นอกจากนี้พบว่าความน่าสนใจของกล้วยหอมมีสารโดปามีน (Chantra-apiruk et al, 2018) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เป็นสารแห่งความสุขข นอกจากนี้ยังทำหน้าที่เป็นฮอร์โมนและสารสื่อประสาท และมีความสนใจในการพัฒนาสูตรถ้าสูตรคอมบูชาที่มีหญ้าหวานและกล้วยหอมเหมือนกันแต่เปลี่ยนชนิดของชาผลจะแตกต่างกันอย่างไรจึงเลือกชาที่ศึกษาโดยเปรียบเทียบ 4 สูตร ดังนี้ ชาดอกดาวเรือง ชาปลีกล้วยน้ำว้า ชาลูกน้ำนม และชาใบมะม่วง ผลการทดลองการยับยั้งอนุมูลอิสระของคอมบูชาทั้ง 4 สูตร พบว่าสูตรที่มีส่วนผสมของชาใบมะม่วงดีที่สุด และสูตรที่มีส่วนผสมกล้วยหอมเป็นสูตรที่ดีที่สุดเมื่อเจือจาง ความเข้มข้นดังนี้ 50% (X/2), 25% (X/4) และ 12.5% (X/8) โดยแสดงฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 104.66% 99.54% และ 96.80% ตามลำดับ ตามลำดับ และมีส่วนผสมของชาดอกดาวเรืองเป็นสูตรที่ดีรองลงมา ผลแสดงในภาพที่ 4 (Figure 4) ซึ่งผลการทดลองแปรผันตามปริมาณปริมาณฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ ผลแสดงในภาพที่ 7 (Figure 7) และผลไปทิศทางเดียวกับ

งานวิจัยของ Osiripun & Apisittiwong (2021) การเปรียบเทียบผลการทดลองทั้งหมด 10 สูตรของคอมบูชา ได้ข้อสรุปดังนี้ สูตรคอมบูชาที่ดีที่สุดคือสูตรที่มีส่วนผสมของใบมะม่วง หญ้าหวาน และกล้วยหอม สูตรที่ดีรองลงมาคือสูตรที่มีส่วนผสมชาดอกดาวเรือง หญ้าหวาน และกล้วยหอม จากผลการทดลองคอมบูชาสูตรที่มีใบมะม่วงดีกว่าคาดว่าในใบมะม่วงมีสารแมงจิเฟอรินในปริมาณที่มากเมื่อสกัดด้วยน้ำ (ชงชา) เป็นสารกลุ่ม xanthone glycoside มีปริมาณแมงจิเฟอริน จำนวน 5.86±0.26 %w/w (Tayana et al, 2019) จากข้อมูลที่ได้นำไปสู่การสร้างผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มเพื่อสุขภาพและสามารถต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ได้ เช่นทำเป็นผงเป็นส่วนผสมของเครื่องดื่ม และเบเกอรี

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาสูตรคอมบูชาโดยใช้ชาดอกดาวเรืองโดยควบคุมการหมัก 14 วัน (F1) และเพิ่มผลไม้หมักต่อ 5 วัน (F2) ปริมาณน้ำตาล 80 กรัมต่อลิตร และปริมาณหัวเชื้อหมักจากจากสับปะรด 50 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองพบว่า คอมบูชาดอกดาวเรืองมีสีอ่อนลงเมื่อเทียบกับสีของชาก่อนหมักและมีสีตามชนิดของผลไม้ มีรสเปรี้ยว ค่า pH 3-3.5 การศึกษาและเปรียบเทียบสูตรการหมักคอมบูชา มีการเปรียบเทียบ 3 ขั้นตอนเพื่อให้ได้สูตรการหมักที่ดีที่สุด การศึกษามีดังนี้ 1) เปรียบเทียบส่วนผสมที่มีหญ้าหวานกับไม่มีหญ้าหวานในชาดอกดาวเรืองที่เหมือนกัน พบว่าคอมบูชาดอกดาวเรืองที่มีหญ้าหวานแสดงฤทธิ์ที่ดีกว่าไม่มีหญ้าหวาน 2) เปรียบเทียบส่วนผสมที่มีผลไม้ไม่เหมือนกัน (กล้วยหอม มิกซ์เบอร์รี มัลเบอร์รี และสตรอว์เบอร์รี) ในชาดอกดาวเรืองผสมหญ้าหวานที่เหมือนกัน พบว่ากล้วยหอมเป็นผลไม้ที่ให้ผลต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและมีปริมาณฟีนอลิกที่ดีที่สุด 3) เปรียบเทียบส่วนผสมที่มีชาไม่เหมือนกัน (ดอกดาวเรือง ปลีกล้วยน้ำว้า ลูกน้ำนม และใบมะม่วง) ในหญ้าหวานและผสมกล้วยหอมที่เหมือนกัน พบว่า ใบมะม่วงเป็นชาที่ให้ผลต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและมีปริมาณฟีนอลิกที่ดีที่สุด และเมื่อเทียบชาดอกดาวเรืองกับชาชนิดอื่นสรุปผลจากผลการทดลองทั้งหมด 10 สูตร สูตรชาใบมะม่วงผสมหญ้าหวานผสมกล้วยหอมเป็นสูตรที่ดีที่สุด และดีรองลงมาคือคอมบูชาสูตรชาดอกดาวเรืองผสมหญ้าหวานผสมกล้วยหอม ไปสู่การสร้างผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มเพื่อสุขภาพเพื่อเพิ่มโปรไบโอติกและสามารถต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ได้ ยกตัวอย่างเช่นทำเป็นผงเป็นส่วนผสมของเครื่องดื่ม และเบเกอรี

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณแผ่นดิน กองทุนวิจัย มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม งานวิจัยนี้ได้รับงบประมาณประเภททุนพัฒนางานวิจัยและนวัตกรรมเพื่อพัฒนาเศรษฐกิจชีวภาพ เศรษฐกิจหมุนเวียน เศรษฐกิจสีเขียว และเศรษฐกิจสร้างสรรค์ BCG Creative Economy ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2566 (สัญญาทุนเลขที่ RDI-2-66-58)

เอกสารอ้างอิง

Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM, Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Proceedings of the National Academy of Sciences 1993;90(17):7915-7922.

Bhattacharya S, Gachhui R, Parames C. Sil, Effect of Kombucha, a fermented black tea in attenuating oxidative stress mediated tissue damage in alloxan induced diabetic rats. Food and chemical toxicology. 2013;60:328-340.

Braca A, Sortino C, Politi M, Morelli I, Mendez J. Antioxidant activity of flavonoids from Licania licaniaeflora. Journal of ethnopharmacology 2002;79(3):379-381.

Brandle JE, Rosa N. Heritability for yield, leaf: stem ratio and stevioside content estimated from a landrace cultivar of Stevia rebaudiana. Canadian journal of plant Science 1992;72(4):1263-1266.

Chantra-apiruk S, Romphophak T, Kaewprasit C, Loisruangsin A. Dopamine Contents in Hom Thong Bananas during Storage at 14 and 25°C. YRU Journal of Science and Technology 2018;3(2):88-93.

Hardoko E, Harisman K, Yunita E. Puspitasari. The kombucha from Rhizophora mucronata Lam. herbal tea: Characteristics and the potential as an antidiabetic beverage. Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research 2020;8(5):410-421.

Ibrahim SS, Abd-El Salam SS, Amer MM, Mohamed AF, Emam SM, El-Sharkawy RM. Evaluation of antioxidant activities of kombucha green tea. International Journal of advanced research 2019; 7(1):947-954.

Isantia O, Wongkrajang K. The investigation of the extraction solvent system of total phenolics and flavonoids–rich extracts and antioxidant activity from Tagetes erecta flower. Science and Technology Nakhon Sawan Rajabhat University Journal 2016;7(7):28-40.

Karolina J, Justyna K, Joanna K, Katarzyna J. Chemical profile and antioxidant activity of the Kombucha Beverage Derived from White, Green, Black and Red Tea, Antioxidants 2020;9:447.

Majid AA, Suroto DA, Rahayu ES. Probiotic potential of kombucha drink from butterfly pea (*Clitoria ternatea* L.) flower with the addition of Lactiplantibacillus plantarum subsp. plantarum Dad-13. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 2023;51:102776.

Osiripun V, Apisittiwong T. Polyphenol and antioxidant activities of Kombucha fermented from different teas and fruit juices Vanida. Journal of Current Science and Technology 2021;11(2):188-196.

Priyanka D, Shalini T, Verma NK. A brief study on marigold (Tagetes erecta): a review. International Research Journal of Pharmacy 2013;4(1):26-27.

Phakamus S, Chokrathok S, Woraratphoka J, Sasidhorn Innok S. Development of Yanang Mixed Herb Tea Products. Burapha Science Journal 2561;23(3):1682-1695.

Philippe J. Blanc, Characterization of the tea fungus metabolites. Biotechnology letters 1996;18:139-142.

Srisook K, Salee P, Srisook E. In vitro anti-oxidant and anti-tyrosinase activities of the rhizomal extracts from Amomum biflorum Jack. Thai Journal of Botany 2010;2:143-150.

Soto SAV, Beaufort S, Bouajila J, Souchard JP, Taillandie P. Understanding kombucha tea fermentation: A Review. Journal of Food Science 2018;83:580-588.

Tayana N., Inthakusol W, Duangdee N, Chewchinda S, Pandith H, Kongkiatpaiboon S. Mangiferin content in different parts of mango tree (*Mangifera indica* L.) in Thailand. Songklanakarin Journal Science Technology 2019:41(3):522-528.

Thiangket T, Luenloi W, Surayot P, Wongkrajang K. Comparison of chemical composition and antioxidant activity of tea and kombucha extracts (banana blossom). The 5th National Conference on Science Technology and Innovation 2022:11-17.

Urrutia MAD, Ramos AG, Menegusso RB, Lenz RD, Ramos MG, Tarone AG, Cazarin CB, Cottica SM, Vessaro da Silva SA. Bernardi DM, Effects of supplementation with kombucha and green banana flour on Wistar rats fed with a cafeteria diet. Heliyon 2021;7:e07081.

Zhen JZ, Yu-cheng S, Hua-wei W, Cai-bi Z, Xian-chun, Jian Z. Flavour chemical dynamics during fermentation of kombucha tea. Emirates Journal of Food and Agriculture. 2018;30(9):732-741.