วารสารแก่นเกษตร THAIJO

Content List Available at ThaiJo

Khon Kaen Agriculture Journal

Journal Home Page : https://li01.tci-thaijo.org/index.php/agkasetkaj



ผลของระดับ *Lactobacillus casei* และพลูคาว (*Houttuynia cordata* Thunb.) ต่อสมบัติทางเคมี กายภาพ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำหมักชีวภาพพลูคาว

Effects of different levels of *Lactobacillus casei* and *Houttuynia cordata* Thunb. on chemical, physical and antioxidant properties of bio-fermented *Houttuynia cordata* juice

นิสากร ปินตาพรม[1], ศรีสรรค์ ปูพบุญ[2], วิไลลักษณ์ ศิริพรอดุลศิลป์[3], ธีรพร กทิศาสตร์[4] และ สาวิตรี วงศ์ตั้งถิ่นฐาน[1]*

Nisakon Pintaphrom[1], Srisan Phupaboon[2], Wilailak Siripornadulsil[3], Teeraporn Katisart[4] and Sawitree Wongtangtintharn[1]*

[1] *สาขาวิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
[1] *Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University*
[2] *ศูนย์วิจัยและพัฒนาทรัพยากรอาหารสัตว์เขตร้อน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
[2] *Tropical Feed Resources Research and Development Center, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University*
[3] *สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
[3] *Department of Microbiology, Faculty of Science, Khon Kaen University*
[4] *สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม*
[4] *Department of Biology, Faculty of Science, Mahasarakham University*

บทคัดย่อ: งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของระดับ *Lactobacillus casei* (*L. casei*) และผงพลูคาว (*Houttuynia cordata* powder: HCP) ที่มีต่อคุณสมบัติทางเคมี กายภาพ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำหมักชีวภาพพลูคาว วางแผนการทดลองแบบ 4 × 3 factorial in completely randomized design (CRD) โดยมีปัจจัย A คือ ระดับของ *L. casei* ได้แก่ 0, 1, 10 และ 20% (v/v) ตามลำดับ และปัจจัย B คือ ระดับของ HCP ได้แก่ 10, 12.5 และ 15% (w/v) ตามลำดับ วิเคราะห์ข้อมูลประกอบด้วย ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด ปริมาณสารฟีนอลิก ปริมาณฟลาโวนอยด์ ปริมาณเควอร์ซิทริน ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH IC_{50} และ ABTS IC_{50} ความชื้น ค่า pH ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด และความเป็นกรดทั้งหมด ผลการทดลองพบว่า ทั้งปัจจัยระดับของ *L. casei* และ HCP ส่งผลต่อคุณสมบัติของน้ำหมักชีวภาพอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยเฉพาะในกลุ่มที่เติม *L. casei* 1% ร่วมกับ HCP 15% พบว่า มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดสูงที่สุด 8.667 × 10^6 CFU/ml ปริมาณสารฟีนอลิก 22.351 มก./ก. ปริมาณฟลาโวนอยด์ 13.874 มก./ก. และปริมาณเควอร์ซิทริน 904.438 มคก./ล. พร้อมทั้งมีค่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในระดับดี โดยมีค่า DPPH IC_{50} 398.297 มคก./มล. และ ABTS IC_{50} 145.239 มคก./มล. ทั้งนี้เมื่อพิจารณาจากค่าปริมาณจุลินทรีย์ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ การเติม *L. casei* 1% ร่วมกับ HCP 15% แสดงถึงศักยภาพในการพัฒนาน้ำหมักชีวภาพพลูคาวที่มีคุณภาพทางเคมี กายภาพ และฤทธิ์ทางชีวภาพที่เหมาะสมต่อการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมปศุสัตว์อย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ: พลูคาว; *Lactobacillus casei*; น้ำหมักชีวภาพ; ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ; เควอร์ซิทริน

ABSTRACT: This study aimed to investigate the effects of different levels of *Lactobacillus casei* (*L. casei*) and *Houttuynia cordata* powder (HCP) on the chemical, physical properties and antioxidant activity of bio-fermented juice. The experiment was arranged in a 4 × 3 factorial in a completely randomized design (CRD). Factor A consisted of four levels of *L. casei* at 0, 1, 10 and 20% (v/v), and Factor B comprised three levels of HCP at 10, 12.5 and 15%

* Corresponding author: sawiwo@kku.ac.th

Received: date; January 2, 2025 Revised: date; March 26, 2025

Accepted: date; April 1, 2025 Published: date; July 16, 2025

(w/v). The variables analyzed included total bacterial count, total phenolic content, total flavonoid content, quercitrin concentration, antioxidant activity (DPPH IC_{50} and ABTS IC_{50}), moisture content, pH, total soluble solids, and total acidity. The results demonstrated that both the levels of *L. casei* and HCP significantly influenced the properties of bio-fermented Houttuynia cordata juice ($p<0.05$). Notably, the group supplemented with 1% *L. casei* and 15% HCP showed the highest total bacterial count at 8.667×10^6 CFU/ml, along with a total phenolic content of 22.351 mg/g, total flavonoid content of 13.874 mg/g, and quercitrin content of 904.438 µg/L. In addition, this group exhibited favorable antioxidant activities, with DPPH IC_{50} and ABTS IC_{50} values of 398.297 µg/ml and 145.239 µg/ml, respectively. These findings indicate a well-balanced combination of microbial population, bioactive compounds, and antioxidant capacity, highlighting the potential of using 1% *L. casei* with 15% HCP as an optimal formulation for producing bio-fermented *Houttuynia cordata* juice with desirable chemical, physical, and biological properties suitable for application in the livestock industry.
Keywords: *Houttuynia cordata*; *Lactobacillus casei*; bio-fermented juice; antioxidant activity; quercitrin

บทนำ

อุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ปีกมีบทบาทสำคัญในเศรษฐกิจ โดยเฉพาะในด้านการผลิตเนื้อไก่และไข่ไก่ ซึ่งเป็นแหล่งโปรตีนที่จำเป็นและเข้าถึงง่ายสำหรับผู้บริโภคทั่วโลก อย่างไรก็ตาม ความเครียดที่เกิดขึ้นในสัตว์ปีกเนื่องจากปัจจัยด้านการจัดการที่ไม่เหมาะสมและสภาพแวดล้อมที่ไม่เอื้ออำนวย อาจส่งผลให้เกิดการเพิ่มขึ้นของสารอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species: ROS) ซึ่งมีผลกระทบต่อระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ ทำให้เกิดความอ่อนแอและเสี่ยงต่อการติดเชื้อหรือโรคต่าง ๆ ได้ง่ายยิ่งขึ้น (ใจพร, 2555)

ในปัจจุบันแนวโน้มอุตสาหกรรมปศุสัตว์ทั่วโลกหันมาให้ความสำคัญกับการลดการใช้ยาปฏิชีวนะในสัตว์อย่างจริงจัง เพื่อส่งเสริมความปลอดภัยของผู้บริโภคและลดความเสี่ยงต่อการเกิดเชื้อดื้อยา ซึ่งเป็นปัญหาเชิงสาธารณสุขระดับโลก โดยเฉพาะในภาคการผลิตอาหารสัตว์ การใช้ยาปฏิชีวนะโดยไม่เหมาะสม อาจนำไปสู่การตกค้างในผลผลิตสัตว์ และเพิ่มโอกาสในการถ่ายทอดเชื้อดื้อยาสู่มนุษย์ผ่านห่วงโซ่อาหาร (Kahn et al., 2019) ดังนั้นจึงเกิดแนวทางการพัฒนาสารเสริมสุขภาพจากธรรมชาติเพื่อทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ โดยเฉพาะพืชสมุนไพรและจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ ซึ่งไม่เพียงช่วยส่งเสริมสุขภาพสัตว์ แต่ยังสอดคล้องกับแนวโน้มการผลิตอาหารที่ปลอดภัยและยั่งยืนในระดับสากล

พลูคาว (*Houttuynia cordata* Thunb.) เป็นพืชสมุนไพรจีนที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในประเทศจีน ญี่ปุ่น และเกาหลี พลูคาวมีองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญ 6 ประเภท ได้แก่ น้ำมันหอมระเหย (volatile oil) ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) อัลคาลอยด์ (alkaloids) กรดไขมัน (fatty acids) ไฟโตสเตอรอล (phytosterols) และสารประกอบเคมีอื่น ๆ เช่น กรดโพลีฟีโนลิก (polyphenolic acid) และแร่ธาตุ เช่น ฟลูออไรด์ (fluoride) โพแทสเซียมคลอไรด์ (potassium chloride) และโพแทสเซียมซัลเฟต (potassium sulfate) ซึ่งมีความหลากหลายทางเภสัชวิทยาในการป้องกันจุลินทรีย์ที่ก่อโรค ต้านการอักเสบ และกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2546) การเสริมพลูคาวในสูตรอาหารไก่ไข่แสดงให้เห็นว่าไม่มีผลกระทบเชิงลบต่อผลผลิตหรือคุณภาพของไข่ (ภัทธิรา, 2561) นอกจากนี้ยังพบว่า การเสริมพลูคาวในระดับ 0.6% มีผลต่อการเพิ่มสีของไข่แดง ($p<0.05$) และการเสริมพลูคาวในระดับ 0.4 และ 0.6% ยังช่วยเพิ่มระดับภูมิคุ้มกันต่อไวรัสนิวคาสเซิลในไก่ไข่ (Hayashi et al., 1995) นอกจากนี้น้ำมันหอมระเหยจากพลูคาวยังมีศักยภาพในการต้านไวรัส เช่น ไวรัสไข้หวัดใหญ่ HSV-1 และ HIV-1 โดยไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ (Morita et al., 1995)

โพรไบโอติก (*probiotic*) มาจากภาษากรีกคำว่า “โพร” (*pro*) หมายถึง "สำหรับ" และ “ไบโอทอส” (*biotos*) หมายถึง "ชีวิต" ดังนั้นจึงมีความหมายว่า "สำหรับชีวิต" หรือ "ส่งเสริมชีวิต" ซึ่งยังคงสื่อความหมายถึงการสนับสนุนชีวิตหรือสุขภาพของสิ่งมีชีวิต (Lilly and Stillwell, 1965) โพรไบโอติกเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีชีวิต โดยการใช้โพรไบโอติกเป็นการเติมจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อระบบทางเดินอาหารของสิ่งมีชีวิต เพื่อให้เกิดความสมดุลของประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้ และส่งผลดีต่อสุขภาพในด้านต่าง ๆ โดยชนิดของโพรไบโอติกที่พบได้ เช่น *L. reuteri, L. casei, L. acidophilus, L. bulgaricus, L. brevis, L. rhamnosus, Saccharomyces boulardii, Bacillus clausii, Bacillus subtilis* และ *Streptococcus thermophiles* (วีระกิจ, 2561) โพรไบโอติกมีบทบาทสำคัญในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค รวมถึงความสามารถในการยึดเกาะกับเยื่อบุผิวลำไส้เพื่อแข่งขันกับจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค อีกทั้งยังสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์ (Mountzouris et al., 2010) และเพิ่มพื้นที่ผิวสำหรับการดูดซึมสารอาหาร ทำให้การดูดซึมอาหารในสัตว์มีประสิทธิภาพมากขึ้น (Afsharmanesh and Sadaghi, 2014) โดยมีการรายงานการใช้โพรไบโอติกชนิด *Bacillus subtilis* และ

Enterococcus faecium ในไก่ไข่ปริมาณ 1 และ 2 กรัม/กิโลกรัมของอาหาร พบว่า มีผลเชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญต่อน้ำหนักตัวสุดท้าย และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักตัว (Hatab et al., 2016) และการศึกษาการใช้โพรไบโอติกชนิด *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ต่าง ๆ ในไก่เนื้อ ในปริมาณ 3 × 10^5 CFU/g ของอาหารสำเร็จรูป พบว่า ช่วยปรับปรุงน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (Wang et al., 2016) พลูคาวมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ต้านจุลินทรีย์ และเสริมภูมิคุ้มกัน ขณะที่ *L. casei* เป็นโพรไบโอติกที่ช่วยปรับสมดุลลำไส้และส่งเสริมการดูดซึมสารอาหาร ทั้งนี้เมื่อนำมาใช้ร่วมกันในการหมักจุลินทรีย์จะย่อยโครงสร้างของพืช ทำให้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ ถูกปลดปล่อยมากขึ้น ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงขึ้น อย่างไรก็ตาม ยังขาดงานวิจัยที่ระบุสัดส่วนที่เหมาะสมของระดับพลูคาวและระดับ *L. casei* เพื่อพัฒนาน้ำหมักชีวภาพพลูคาวสำหรับใช้ในอุตสาหกรรมปศุสัตว์

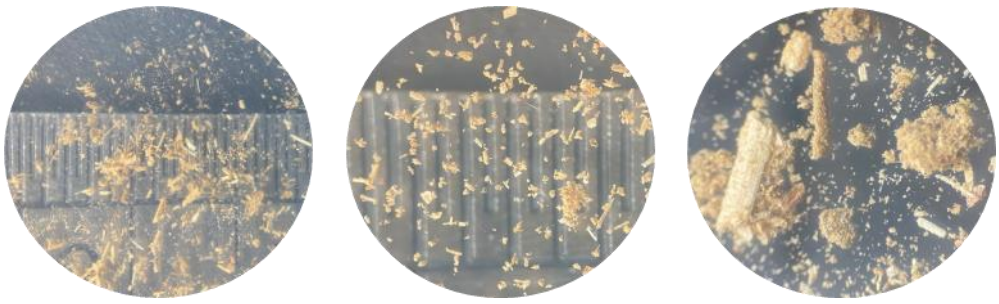
วัตถุประสงค์เพื่อศึกษาศักยภาพของการเสริมพลูคาวร่วมกับจุลินทรีย์โพรไบโอติกในการพัฒนาคุณสมบัติทางเคมี ทางกายภาพ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำหมักชีวภาพพลูคาว ตลอดจนประเมินแนวทางในการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมปศุสัตว์อย่างยั่งยืน โดยมีเป้าหมายเพื่อคัดเลือกสูตรน้ำหมักชีวภาพพลูคาวที่มีความเหมาะสมสูงสุดในด้านคุณสมบัติทางเคมี ทางกายภาพ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เพื่อใช้เป็นต้นแบบในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพ ทั้งนี้เพื่อรองรับการศึกษาต่อยอดการใช้หมักชีวภาพพลูคาวขั้นตอนถัดไปในการประเมินผลต่อสมรรถภาพการผลิต คุณภาพไข่ และสุขภาพของไก่ไข่ต่อไป

สมมุติฐานของงานวิจัยนี้คือ การใช้โพรไบโอติกสายพันธุ์ *L. casei* ร่วมกับผงพลูคาวในระดับที่เหมาะสมจะส่งผลต่อการปรับปรุงคุณสมบัติทางเคมี กายภาพ และสารสำคัญทางชีวภาพของผลิตภัณฑ์น้ำหมักชีวภาพพลูคาว โดยสภาวะการหมักที่เหมาะสมจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์และคุณสมบัติที่เป็นประโยชน์ต่อการประยุกต์ใช้ในภาคการผลิต

วิธีการศึกษา

การเตรียมพลูคาว

พลูคาว (*Houttuynia cordata* Thunb.) ที่ใช้ในงานวิจัยนี้จากอำเภอพาน จังหวัดเชียงราย ประเทศไทย โดยมีอายุการเก็บเกี่ยว 3 เดือน ในช่วงเดือนมีนาคม พ.ศ. 2565 นำพลูคาวสดมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำที่มีคลอรีนอิสระในความเข้มข้น 150 ppm จากนั้นนำส่วนใบ ก้านใบ และลำต้น (ไม่รวมราก) มาตัดให้มีความยาวประมาณ 1 ซม. แล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 ℃ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปบดเป็นผงพลูคาว (*Houttuynia cordata* powder; HCP) โดยบดผ่านตะแกรงขนาด 0.40 มม. เพื่อให้ได้ขนาดอนุภาคที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการหมักต่อไป **(Figure 1 และ 2)**



(a) (b) (c)

Figure 1 Stereoscopic micrographs of *H. cordata* powder at (a) 20×, (b) 40× and (c) 60× of magnifications



(a) (b) (c)

Figure 2 Compound micrographs of *H. cordata* powder at (a) 4×, (b) 10× and (c) 40× of magnification

การเตรียมเชื้อ *Lactobacillus casei*

เชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1340 ได้รับจากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) โดยนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว MRS broth ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ (aseptic technique) เพื่อป้องกันการปนเปื้อน บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการถ่ายเชื้อ (subculture) อย่างน้อย 3 ครั้ง เพื่อเพิ่มความแข็งแรงและประสิทธิภาพในการเจริญของจุลินทรีย์ก่อนนำไปใช้ในการทดลอง ตรวจสอบปริมาณจุลินทรีย์โดยวิธี serial dilution pour plate และปรับความเข้มข้นของจุลินทรีย์ให้อยู่ที่ 1×10^8 CFU/ml จากนั้นเก็บรักษาเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เพื่อใช้ในการหมักร่วมกับผงพลูคาวต่อไป ตามวิธีของจริยา และคณะ (2541)

การเตรียมน้ำหมักชีวภาพพลูคาว

น้ำหมักชีวภาพพลูคาวถูกเตรียมโดยออกแบบการทดลองที่มีปัจจัย 2 ปัจจัย ได้แก่ ปัจจัย A คือ *L. casei* ปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้นที่ 1×10^8 CFU/ml โดยกำหนดใน 4 ระดับ คือ 0 (ไม่มีการเติมเชื้อ), 1, 10 และ 20% โดยปริมาตรต่อปริมาตร (v/v) ปัจจัย B คือ ปริมาณผงพลูคาว (*Houttuynia cordata* powder; HCP) โดยกำหนดใน 3 ระดับ คือ 10, 12.5 และ 15% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (w/v)

ขั้นตอนสำหรับการหมักประกอบด้วยน้ำบริสุทธิ์ชนิดรีเวอร์สออสโมซิส (reverse osmosis; RO) ปริมาตร 360 มล. ทำหน้าที่เป็นตัวทำละลาย เติมน้ำตาลทรายบริสุทธิ์ (sucrose) ในอัตรา 2% น้ำหนักต่อปริมาตร (w/v) หรือเท่ากับ 20 ก./ล. ซึ่งเป็นระดับที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ เนื่องจากเป็นแหล่งพลังงานสำคัญของจุลินทรีย์ (Yao et al., 2024) จากนั้นปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของสารละลายให้มีค่าเท่ากับ 6 ซึ่งเป็นค่าที่เหมาะสมต่อการเจริญและการทำงานของจุลินทรีย์ โดยใช้สารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) และโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ที่ความเข้มข้น 0.1 โมล/ล. เป็นตัวควบคุมค่า pH

ภายหลังจากการเตรียมส่วนผสมดังกล่าว ส่วนผสมทั้งหมดจะถูกบรรจุในขวดแก้วขนาด 400 มล. ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปิดฝา แล้วนำไปหมักที่อุณหภูมิห้องระหว่าง 25-30 °C ซึ่งเป็นช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการหมักแบบธรรมชาติในสภาวะแวดล้อมทั่วไป ระยะเวลาการหมักกำหนดไว้ที่ 15 วัน โดยในระหว่างกระบวนการหมักจะมีการควบคุมสภาพแวดล้อมอย่างสม่ำเสมอ เพื่อให้กระบวนการหมักดำเนินไปอย่างมีประสิทธิภาพ หลังจากครบกำหนดการหมัก จะเก็บรวบรวมตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพเพื่อนำไปวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี กายภาพ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่อไป

การบันทึกผล

เมื่อน้ำหมักชีวภาพพลูคาวหมักครบ 15 วัน ทำการนำตัวอย่างมาวิเคราะห์หาคุณสมบัติทางเคมี ทางกายภาพ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำหมักชีวภาพพลูคาว ได้แก่ ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดตามวิธีของจริยา และคณะ (2541)

วิเคราะห์ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด ตามวิธีของ Samchai et al. (2009) ชั่งตัวอย่างในปริมาณ 1 มิลลิลิตร แล้วละลายด้วยเอทานอลความเข้มข้น 80% ปริมาตร 1 มล. เพื่อเตรียมสารละลายตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ จากนั้นตวงสารละลายตัวอย่าง 0.5 มล. ใส่ในขวดปรับปริมาตรสีชา เพื่อป้องกันแสงที่อาจส่งผลกระทบต่อปฏิกิริยา เติมสารละลาย Folin–Ciocalteu's phenol reagent ความเข้มข้น 0.2 N ปริมาตร 2.5 มล. แล้วตั้งทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ปฏิกิริยากับสารตัวอย่างเกิดขึ้น

หลังจากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตที่มีความเข้มข้น 7.5% ปริมาตร 2 มล. แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 10 มล. ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นตั้งสารละลายไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้ปฏิกิริยาดำเนินการสมบูรณ์ เมื่อครบเวลาที่กำหนดนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density: OD) ที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร โดยปริมาณฟีนอลิกรวมในตัวอย่างคำนวณจากค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ ซึ่งเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่สร้างจากสารละลายกรดแกลลิก ผลลัพธ์ที่ได้จะแสดงในหน่วยมิลลิลิตร กรดแกลลิกเทียบเท่าต่อน้ำหนักตัวอย่าง 1 ก. (mg GAE/g extract)

ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดวิเคราะห์ตามวิธีของ Zhishen et al. (1999) ชั่งสารตัวอย่างปริมาณ 1 มล. แล้วละลายด้วยเอทานอลความเข้มข้น 80% ปริมาตร 1 มล. จากนั้นนำสารละลายตัวอย่าง 0.5 มล. ใส่ในขวดปรับปริมาตรสีชาเพื่อป้องกันผลกระทบจากแสงที่อาจรบกวนผลการวิเคราะห์ เติมสารละลายอะลูมิเนียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2.5% ในปริมาตร 0.4 มล. และสารละลายโซเดียมอะซิเดต (ความเข้มข้น 100 ก./ล.) ปริมาตร 0.5 มล. ตามลำดับ จากนั้นเติมน้ำกลั่น 4 มล. ลงในขวดแล้วผสมให้เข้ากันอย่างดี ทิ้งสารละลายไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้ปฏิกิริยาระหว่างตัวอย่างและสารเคมีดำเนินการสมบูรณ์ หลังจากครบเวลา ให้นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density: OD) ที่ความยาวคลื่น 430 นาโนเมตร ใช้สารละลายเควอซิตินเป็นมาตรฐานในการเปรียบเทียบ โดยคำนวณปริมาณฟลาโวนอยด์รวมจากค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้นจากสารละลายเควอซิติน ผลลัพธ์จะแสดงในหน่วย มิลลิลิตร เควอซิตินเทียบเท่าต่อน้ำหนักตัวอย่าง 1 ก. (mg QE/g extract)

ปริมาณเควอร์ซิทริน ซึ่งเป็นสารสำคัญในน้ำหมักชีวภาพ ถูกวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง high-performance liquid chromatography (HPLC) ที่ศูนย์ปฏิบัติการกลาง มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ประเทศไทย โดยการวิเคราะห์เปรียบเทียบพีค สเปกตรัม UV และเวลาเก็บตัวของตัวอย่างกับสารมาตรฐานเควอร์ซิทริน (quercitrin) (Kwon et al., 2012)

ในการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำหมักชีวภาพพลูคาวด้วยวิธี DPPH Assay และ ABTS Assay โดยค่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระถูกแสดงผลในรูปแบบ IC_{50} ตามวิธี Likhitwitayawuid et al. (2005) การวิเคราะห์นี้ใช้สารอนุมูลอิสระ DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปของอนุมูลอิสระคงตัวและมีสีม่วงเข้ม เมื่อสารต้านอนุมูลอิสระทำปฏิกิริยากับ DPPH ซึ่งละลายในเอทานอล จะเกิดการลดลงของอนุมูลอิสระ ส่งผลให้สีม่วงของสารละลายจางลงจนกลายเป็นสีเหลือง การเตรียมสารละลาย DPPH ชั่งสาร DPPH ปริมาณ 0.0079 ก. แล้วละลายในเอทานอล 100 มล. เพื่อเตรียมสารละลาย DPPH reagent ที่พร้อมใช้งาน นำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 100 มคล. ผสมกับสารละลาย DPPH reagent ปริมาตร 100 มคล. ใน 96-well plate จากนั้นตั้งสารละลายในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นจนสมบูรณ์ วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้ trolox เป็นสารมาตรฐาน จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณการยับยั้งอนุมูลอิสระ (% inhibition) โดยใช้สมการที่เหมาะสม ผลลัพธ์จะแสดงถึงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานของ trolox และแสดงในรูปของหน่วย trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) จากสมการ inhibition = [(A0-A1)/A0] × 100 โดยที่ A0 คือ ค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ของสารควบคุม (control) ซึ่งหมายถึงค่าที่ได้จากการวัดสารละลายที่ไม่มีสารต้านอนุมูลอิสระ (เช่น ไม่มีตัวอย่างทดสอบ), A1 คือ ค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ของสารที่มีการเติมตัวอย่างทดสอบ ซึ่งเป็นค่าที่ได้หลังจากเติมสารต้านอนุมูลอิสระ (เช่น น้ำหมักชีวภาพพลูคาว)

การทดสอบนี้ใช้อนุมูลอิสระ ABTS•+ (2,2′-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical) ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่มีสีเขียวปนสีน้ำเงินและสามารถดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร เมื่อทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ สีของสารละลายจะจางลงตามปริมาณอนุมูลอิสระที่ถูกยับยั้ง การเตรียมสารละลาย ABTS ชั่งสาร ABTS ปริมาณ 0.0036 ก. ละลายในน้ำกลั่น 1 มล. จากนั้นเติมโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต (potassium persulfate) ปริมาณ 0.00067 ก. ผสมให้เข้ากัน แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาจนได้สารละลาย ABTS reagent พร้อมใช้งาน นำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 50 มคล. ผสมกับสารละลาย ABTS reagent ปริมาตร 100 มคล. ใน 96-well plate จากนั้นตั้งสารละลายไว้เป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาระหว่างอนุมูลอิสระ ABTS•+ กับสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่าง วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร โดยใช้สาร trolox เป็นมาตรฐานในการเปรียบเทียบ จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณการยับยั้งอนุมูลอิสระ (% inhibition) ด้วยสมการที่เหมาะสม inhibition = [(A0-A1)/A0] × 100 โดยที่ A0 คือ ค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ของสาร

ควบคุม (control) ซึ่งหมายถึงค่าที่ได้จากการวัดสารละลายที่ไม่มีสารต้านอนุมูลอิสระ (เช่น ไม่มีตัวอย่างทดสอบ), A1 คือ ค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ของสารที่มีการเติมตัวอย่างทดสอบ ซึ่งเป็นค่าที่ได้หลังจากเติมสารต้านอนุมูลอิสระ (เช่น น้ำหมักชีวภาพพลูคาว)

การต้านอนุมูลอิสระของสารตัวอย่าง โดยผลลัพธ์จะแสดงในหน่วย trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) เพื่อแสดงถึงประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างเมื่อเทียบกับมาตรฐาน trolox

สมบัติทางกายภาพของน้ำหมักชีวภาพ วิเคราะห์ค่าความชื้น ตามวิธีของ AOAC (2000) และวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ด้วยเครื่องวัด pH (รุ่น HI98103, HANNA Instruments, USA) ตามวิธีของ AOAC (1999) ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด โดยใช้เครื่อง Hand refractometer ตามวิธีของ Ho et al. (2008) และความเป็นกรดทั้งหมด ตามวิธีของ AOAC (2000)

แผนการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ 4 × 3 factorial in completely randomized design (CRD) โดยมี 2 ปัจจัย ได้แก่ ปัจจัย A คือ ระดับของ *L. casei* ที่ความเข้มข้น 1×10^8 CFU/ml แบ่งเป็น 4 ระดับ ได้แก่ 0, 1, 10 และ 20% โดยปริมาตรต่อปริมาตร (v/v) ปัจจัย B คือ ระดับของผงพลูคาว (*Houttuynia cordata* powder; HCP) แบ่งเป็น 3 ระดับ ได้แก่ 10, 12.5 และ 15% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (w/v) และวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นทางสถิติ 95% โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SAS (SAS Institute Inc., 1996)

สถานที่และระยะเวลาทำการทดลอง

การทดลองดำเนินการระหว่างเดือนมีนาคม พ.ศ. 2566 ถึงเดือนเมษายน พ.ศ. 2566 ณ ห้องปฏิบัติการอาหารสัตว์ไม่เคี้ยวเอื้อง สาขาวิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (stereoscopic microscope) ของผงพลูคาวที่ระดับกำลังขยาย 20, 40 และ 60 เท่า แสดงให้เห็นโครงสร้างพื้นผิวและลักษณะภายนอกของตัวอย่างในลักษณะสามมิติ (3D) พบว่า ผงพลูคาวมีลักษณะเป็นชิ้นขนาดเล็กที่มีรูปร่างและขนาดแตกต่างกัน รวมถึงการกระจายตัวของชิ้นส่วนซึ่งอาจเป็นเส้นใยพืชหรืออนุภาคขนาดเล็กที่ประกอบอยู่ในผง การเพิ่มกำลังขยายช่วยให้เห็นรายละเอียดของรูปร่างชิ้นส่วนที่อาจมีลักษณะเป็นเส้นหรือแผ่น รวมทั้งการกระจายตัวของอนุภาคในรูปแบบต่าง ๆ อย่างชัดเจนมากยิ่งขึ้น **(Figure 1)** นอกจากนี้ ยังได้ถ่ายภาพผงพลูคาวด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบคอมพาวด์ (compound microscope) ที่ระดับกำลังขยาย 4, 10 และ 40 เท่า เพื่อศึกษารายละเอียดภายในโครงสร้างของตัวอย่างในเชิงลึก ภาพที่กำลังขยายต่ำ (4 เท่า) แสดงให้เห็นการกระจายตัวของผงโดยรวม ขณะที่ภาพที่กำลังขยายสูงขึ้น (10 และ 40 เท่า) แสดงรายละเอียดของอนุภาคที่มีขนาดเล็กมาก เช่น เศษเส้นใย เซลล์พืชที่แตกตัว โครงสร้างเส้นใย รูพรุน หรือพื้นผิวที่มีลักษณะเฉพาะของผงพลูคาว ซึ่งอาจสะท้อนคุณสมบัติเฉพาะของวัตถุดิบชนิดนี้ **(Figure 2)** โครงสร้างของผงที่มีอนุภาคขนาดเล็กช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสของผงพลูคาว ส่งผลให้จุลินทรีย์สามารถเข้าถึงสารอาหารในวัตถุดิบได้ง่ายขึ้น พื้นที่ผิวสัมผัสที่มากขึ้นยังส่งผลให้เอนไซม์ที่จุลินทรีย์ผลิตออกมาสามารถทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นได้อย่างมีประสิทธิภาพ เช่น การย่อยสลายผนังเซลล์พืชและปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ในทางตรงกันข้าม หากวัตถุดิบมีขนาดใหญ่เกินไป อาจส่งผลให้การกระจายตัวของจุลินทรีย์และสารตั้งต้น (เช่น น้ำตาลหรือสารอาหารอื่น ๆ) ในกระบวนการหมักเกิดขึ้นได้ไม่ทั่วถึง ทำให้กระบวนการหมักดำเนินไปอย่างไม่สม่ำเสมอ

ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในกลุ่มที่ไม่เติม *L. casei* ไม่ตรวจพบจุลินทรีย์ (ND) แสดงให้เห็นว่าการเติมเชื้อโพรไบโอติกมีความจำเป็นต่อการกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์ในการหมัก ขณะที่กลุ่มที่เติม *L. casei* ร่วมกับผงพลูคาวให้ผลการเจริญของจุลินทรีย์แตกต่างกันตามระดับความเข้มข้นของทั้งสองปัจจัย โดยกลุ่มที่เติม *L. casei* 1% ร่วมกับ HCP 15% มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดสูงที่สุด 8.667×10^6 CFU/ml เมื่อเทียบกับกลุ่มอื่น ๆ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ขณะที่การเพิ่มระดับ *L. casei* 20% ส่งผลให้ปริมาณจุลินทรีย์ลดลง ซึ่งอาจเกิดจากความหนาแน่นเริ่มต้นของจุลินทรีย์ที่สูงเกินไป ส่งผลให้เกิดการแข่งขันภายในขวดหมัก ทั้งด้านสารอาหาร พื้นที่ยึดเกาะ และปริมาณออกซิเจน อีกทั้งยังอาจมีการสะสมของกรดอินทรีย์หรือสารเมตาโบไลต์ที่

ส่งผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เอง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของทศพล และคณะ (2559) ที่ระบุว่า การเพิ่มปริมาณเชื้อเริ่มต้นเกินความเหมาะสมสามารถก่อให้เกิดสภาวะไม่สมดุลในกระบวนหมัก และส่งผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ในระยะยาว

ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดในน้ำหมักชีวภาพพลูคาวโดยกลุ่มที่เติม *L. casei* 10 และ 20% ร่วมกับ HCP 15% มีค่า 33.562 และ 33.473 มก./ก. ตามลำดับ สูงที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มอื่น ๆ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.01) การเพิ่มขึ้นของสารฟีนอลิกในกลุ่มที่มีการเติม *L. casei* ร่วมกับ HCP ในระดับที่เหมาะสม อาจเกิดจากกระบวนการหมักที่ช่วยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์จากจุลินทรีย์ ซึ่งมีบทบาทในการสลายโครงสร้างผนังเซลล์ของพืช เช่น ลิกนินและเฮมิเซลลูโลส ทำให้สามารถปลดปล่อยสาร ฟีนอลิกที่เดิมอยู่ในรูปที่จับแน่นกับผนังเซลล์ออกมาได้มากขึ้น (Hur et al., 2014) นอกจากนี้เอนไซม์จากจุลินทรีย์บางชนิด เช่น เฟอรูลิเอสและเบตากลูคาเนส ยังมีบทบาทสำคัญในการแยกพันธะระหว่างสารฟีนอลิกกับโครงสร้างพอลิเมอร์ในพืช ซึ่งช่วยให้สารเหล่านี้อยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้และออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้มากขึ้น

ปริมาณฟลาโวนอยด์ในกลุ่มที่ไม่มีการเติม *L. casei* ร่วมกับ HCP 15% มีปริมาณฟลาโวนอยด์สูงสุด 20.701 มก./ก. สูงที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มอื่น ๆ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.01) โดยผงพลูคาวสามารถส่งเสริมการต้านอนุมูลอิสระได้ อย่างไรก็ตาม ในกลุ่มที่ใช้ *L. casei* 20% พบว่า ปริมาณฟลาโวนอยด์ลดลง ซึ่งอาจเกิดจากการที่จุลินทรีย์มีการใช้สารฟลาโวนอยด์เป็นแหล่งพลังงานในการเจริญของจุลินทรีย์

ปริมาณเควอร์ซิทรินในกลุ่มที่ไม่มีการเติม *L. casei* ร่วมกับ HCP 15% มีค่าสูงที่สุด 1,630.895 มก./ล. เมื่อเทียบกับกลุ่มอื่น ๆ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.01) แสดงให้เห็นว่าในสภาวะที่ไม่มีการเติมจุลินทรีย์ เควอร์ซิทรินอาจไม่ถูกใช้เป็นแหล่งพลังงานหรือแปรสภาพโดยกระบวนการเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ ทำให้ยังคงอยู่ในน้ำหมักชีวภาพพลูคาวในปริมาณสูง อย่างไรก็ตาม เควอร์ซิทรินในรูปแบบที่ไม่ผ่านการแปรสภาพดังกล่าว อาจยังไม่มีความพร้อมทางชีวภาพ (bioavailability) ที่เพียงพอสำหรับการดูดซึมหรือออกฤทธิ์ในสิ่งมีชีวิตได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยปกติแล้วสารฟลาโวนอยด์รวมถึงเควอร์ซิทรินที่พบในพืชมักอยู่ในรูปที่จับกับหมู่ไกลโคไซด์หรือยึดเกาะกับองค์ประกอบของผนังเซลล์พืช เช่น เซลลูโลส ลิกนิน หรือเฮมิเซลลูโลส ซึ่งไม่สามารถดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้โดยตรง จำเป็นต้องผ่านกระบวนการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์หรือเอนไซม์เฉพาะก่อน จึงจะสามารถปลดปล่อยเควอร์ซิทรินออกมาในรูปที่พร้อมสำหรับการดูดซึมหรือฤทธิ์ทางชีวภาพในสิ่งมีชีวิตได้ (Guo et al., 2020)

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากการวัดค่า IC_{50} ด้วยวิธี DPPH พบว่า กลุ่มที่ไม่ได้เติม *L. casei* ร่วมกับ HCP 15% มีค่าต่ำที่สุด คือ 327.457 มคก./มล. เมื่อเทียบกับกลุ่มอื่น ๆ (p<0.01) นอกจากนี้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากการวัดค่า IC_{50} ด้วยวิธี ABTS พบว่า กลุ่มที่ไม่ได้เติม *L. casei* ร่วมกับ HCP 12.5 และ 15% มีค่า 124.317 และ 115.172 มคก./มล. ตามลำดับ อีกทั้งกลุ่มที่เติม *L. casei* 10% ร่วมกับ HCP 15% มีค่า 124.356 มคก./มล. มีค่าน้อยกว่ากลุ่มอื่น ๆ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.01) โดยค่าที่ต่ำแสดงถึงความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระได้สูงที่สุดในกลุ่มทดลองทั้งหมด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงในกลุ่มดังกล่าวสอดคล้องกับปริมาณของสารฟลาโวนอยด์และเควอร์ซิทรินที่พบในระดับสูง เนื่องจากการไม่มีจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักอาจทำให้สารเหล่านี้ไม่ถูกนำไปใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึม ส่งผลให้ยังคงอยู่ในปริมาณมากในน้ำหมักชีวภาพพลูคาว (Filannino et al., 2014) นอกจากนี้ การเพิ่มขึ้นของกรดอินทรีย์ในกระบวนการหมักอาจมีบทบาทสำคัญในการส่งเสริมฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากสภาวะที่มีค่า pH ต่ำสามารถเสริมการทำงานของสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น ดังที่ Shori (2013) รายงานว่า กรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักสามารถเพิ่มฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้อย่างมีนัยสำคัญ **(Table 1)**

อย่างไรก็ตาม การอบแห้งพลูคาวที่อุณหภูมิ 70 °C อาจส่งผลต่อองค์ประกอบทางเคมีภายในพืช โดยเฉพาะปริมาณโปรตีนในแต่ละส่วนของพืช ซึ่ง Pradhan et al. (2023) รายงานว่า ราก ใบ และเหง้าของพลูคาวที่ผ่านการอบแห้งมีปริมาณโปรตีน 12.22, 8.13 และ 11.5% ตามลำดับ โดยวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC และ Micro-Kjeldahl ทั้งนี้การอบแห้งพลูคาวยังอาจทำให้เกิดการสูญเสียสารสำคัญบางชนิด เช่น ฟลาโวนอยด์และโพลีฟีนอลบางส่วน นอกจากนี้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแบบให้อิเล็กตรอน (reducing antioxidant activity) มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นหลังการอบแห้ง ซึ่งแสดงถึงกลไกการต้านอนุมูลอิสระผ่านการให้อิเล็กตรอนที่ยังคงมีประสิทธิภาพอยู่ในระดับสูง อันเป็นผลจากสารออกฤทธิ์บางกลุ่มที่สามารถคงสภาพไว้ได้ในสภาวะความร้อน (นักสิทธิ์, 2554)

Table 1 Antioxidant activity and bioactive compound contents of bio-fermented *Houttuynia cordata* juice as affected by different levels of *Lactobacillus casei* and *Houttuynia cordata* powder

Items	Total bacteria count (CFU/ml)	Total phenolic compound (mg/g)	Total flavonoid content (mg/g)	Quercitrin (mg/L)	DPPH assay IC_{50} (µg/ml)	ABTS assay IC_{50} (µg/ml)
L. casei 0%						
HCP 10%	ND	23.360^{d}	15.865^{cd}	760.133^{bc}	366.194^{e}	244.129^{a}
HCP 12.5%	ND	23.598^{d}	16.491^{b}	913.286^{b}	347.180^{f}	124.317^{ef}
HCP 15%	ND	30.189^{bc}	20.701^{a}	$1,630.895^{a}$	327.457^{g}	115.172^{f}
L. casei 1%						
HCP 10%	6.333×10^{6c}	24.489^{d}	14.471^{f}	879.311^{b}	397.246^{bc}	138.311^{cd}
HCP 12.5%	8.000×10^{6b}	27.458^{c}	16.093^{c}	840.685^{b}	370.364^{e}	129.559^{de}
HCP 15%	8.667×10^{6a}	22.351^{d}	13.874^{g}	904.438^{b}	398.297^{bc}	145.239^{c}
L. casei 10%						
HCP 10%	1.533×10^{6ef}	29.287^{bc}	13.874^{g}	746.725^{bc}	423.591^{a}	140.828^{c}
HCP 12.5%	1.833×10^{6de}	30.534^{b}	14.357^{f}	848.180^{b}	411.282^{ab}	143.847^{c}
HCP 15%	2.377×10^{6d}	33.562^{a}	15.666^{d}	710.581^{bc}	390.476^{cd}	124.356^{ef}
L. casei 20%						
HCP 10%	1.633×10^{5g}	29.851^{bc}	12.992^{h}	446.945^{c}	419.426^{a}	158.591^{b}
HCP 12.5%	1.933×10^{5g}	29.762^{bc}	14.301^{f}	706.652^{bc}	413.093^{ab}	142.309^{c}
HCP 15%	9.667×10^{5f}	33.473^{a}	14.955^{e}	606.034^{bc}	375.934^{de}	141.078^{c}
SEM	1.960×10^{5}	0.911	0.113	117.156	5.157	3.362
L. casei (A)						
0%	ND	25.716^{b}	17.686^{a}	$1,101.438^{a}$	346.944^{c}	161.206^{a}
1%	8.889×10^{6a}	24.766^{b}	14.813^{b}	874.811^{b}	388.635^{b}	137.703^{c}
10%	1.911×10^{6b}	31.127^{a}	14.632^{b}	768.495^{bc}	408.451^{a}	136.344^{c}
20%	4.411×10^{5c}	31.028^{a}	14.082^{c}	586.544^{c}	402.817^{a}	147.326^{b}
HCP (B)						
10%	2.424×10^{6b}	26.747^{b}	14.301^{c}	708.279^{b}	401.614^{a}	170.465^{a}
12.5%	2.673×10^{6b}	27.838^{b}	15.310^{b}	827.201^{ab}	385.480^{b}	135.008^{b}
15%	3.333×10^{6a}	29.894^{a}	16.299^{a}	962.987^{a}	373.041^{c}	131.461^{b}
Significance of main effect and interaction						
L. casei (A)	<0.01	<0.01	<0.01	<0.05	<0.01	<0.01
HCP (B)	<0.01	<0.01	<0.01	<0.05	<0.01	<0.01
A*B	<0.05	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

$^{a–h}$ Means within columns with difference superscript letters differ at (p<0.05). SEM: standard error of the mean.

L. casei: *Lactobacillus casei*. HCP: *Houttuynia cordata* powder. ND: not detected

ความชื้นของน้ำหมักชีวภาพพลูคาวในกลุ่มที่ไม่เติม *L. casei* ร่วมกับ HCP 15% มีความชื้นต่ำที่สุด 94.672% เมื่อเทียบกับกลุ่มอื่น ๆ (p<0.01) ผลที่พบอาจเกิดจากปริมาณผงพลูคาวที่สูง ซึ่งมีสมบัติดูดซับน้ำได้ดี ส่งผลให้ปริมาณน้ำในขวดหมักลดลง นอกจากนี้ ในกลุ่มที่ไม่มีการเติมจุลินทรีย์ จะไม่เกิดการสร้างสารเมตาโบไลต์ที่อาจมีบทบาทในการรักษาความชื้นภายในขวดหมัก อีกทั้งการลดลงของความชื้นยังอาจสัมพันธ์กับการสลายตัวของโครงสร้างเนื้อเยื่อพืชในระหว่างกระบวนการหมัก ซึ่งส่งผลให้ความสามารถในการอุ้มน้ำของผงพลูคาวลดลง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การสลายของผนังเซลล์พืชอันเป็นผลจากการทำงานของเอนไซม์หรือกรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นระหว่างการหมัก มีส่วนทำให้สารประกอบภายในพืช เช่น น้ำ สารฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ ถูกปลดปล่อยออกมาได้มากยิ่งขึ้น

ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของน้ำหมักชีวภาพพลูคาวลดลงตามระดับของ *L. casei* ที่เพิ่มขึ้น โดยกลุ่มที่ใช้ *L. casei* 10% ร่วมกับ HCP 12.5% มีค่า pH ต่ำที่สุด คือ 3.200 เมื่อเทียบกับกลุ่มอื่น ๆ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.01) ซึ่งแสดงถึงการเกิดกรดอินทรีย์ในระดับสูง เป็นผลจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของแบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria: LAB) ที่เปลี่ยนน้ำตาลเป็นกรดแลคติกและกรดอะซิติก ซึ่งเป็นกลไกหลักของการหมักที่ส่งผลให้ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลง ซึ่งส่งผลต่อความเสถียรและคุณสมบัติทางเคมีของน้ำหมัก โดย pH ที่อยู่ในระดับต่ำมีส่วนช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ก่อการเสื่อมคุณภาพของน้ำหมักชีวภาพพลูคาว เช่น *Enterobacter*, *E. coli* และ *Clostridium spp*. ทำให้สามารถยืดอายุการเก็บรักษาได้ดีขึ้น อีกทั้งยังช่วยรักษาสารสำคัญทางชีวภาพ เช่น ฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ โดยในสภาวะกรดอ่อน สารออกฤทธิ์เหล่านี้มีแนวโน้มคงรูปทางโครงสร้างได้ดีกว่า ลดโอกาสเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน และส่งเสริมฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์ (Chen et al., 2019) สอดคล้องกับการศึกษาของทศพลและคณะ (2559) รายงานว่า น้ำหมักกระชายดำร่วมกับพลูคาวที่ผ่านการหมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก มีค่า pH อยู่ในช่วง 3.2-3.8 ซึ่งถือว่าอยู่ในช่วงที่เหมาะสมสำหรับการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ส่งผลต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดในกลุ่มที่ไม่เติม *L. casei* ร่วมกับ HCP 15% และในกลุ่มที่เติม *L. casei* 20% ร่วมกับ HCP 15% ซึ่งทั้งสองกลุ่มมีค่าเท่ากัน 5.200 °Brix มีค่ามากที่สุด เมื่อเทียบกับกลุ่มอื่น ๆ (p<0.01) ค่าของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดที่เพิ่มขึ้นแสดงถึงการสะสมของสารชีวภาพต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการหมัก เช่น น้ำตาล สารฟีนอลิก และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ โดยเฉพาะในกลุ่มที่มี HCP ในระดับสูง การปลดปล่อยสารเหล่านี้เกิดจากเอนไซม์จากจุลินทรีย์ ซึ่งมีบทบาทในการย่อยสลายโครงสร้างพืช ทำให้สารที่เคยจับกับผนังเซลล์ถูกปลดปล่อยออกมาในรูปที่ละลายน้ำได้ดีขึ้น และสะสมอยู่ในน้ำหมักชีวภาพพลูคาวมากยิ่งขึ้น อย่างไรก็ตาม การที่กลุ่มที่ไม่ได้เติม *L. casei* ร่วมกับ HCP 15% ให้ค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเทียบเท่ากับกลุ่มที่เติม *L. casei* 20% ร่วมกับ HCP 15% เป็นผลจากผงพลูคาวในระดับสูงสามารถปลดปล่อยออกฤทธิ์ทางชีวภาพบางชนิดออกมาได้โดยตรงจากโครงสร้างพืชผ่านปฏิกิริยาทางกายภาพ เช่น การแตกตัวของโครงสร้างเซลล์ในสภาวะกรดอ่อน โดยไม่จำเป็นต้องพึ่งจุลินทรีย์ ทั้งนี้กลุ่มนี้ไม่มีการเติมจุลินทรีย์โพรไบโอติก จึงไม่สามารถจัดเป็นกลุ่มที่มีคุณสมบัติด้านการเป็นโพรไบโอติกได้

ปริมาณกรดทั้งหมดในกลุ่มที่เติม *L. casei* 20% ร่วมกับ HCP 12.5 และ 15% มีค่า 1.964 และ 1.973% ตามลำดับ ซึ่งมีค่าสูงที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มอื่น ๆ (p<0.05) เป็นผลมาจากการผลิตกรดอินทรีย์ในปริมาณมากในระหว่างกระบวนการหมัก โดยกรดอินทรีย์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติก ได้แก่ กรดแลคติกและกรดอะซิติก ซึ่งเกิดจากการเผาผลาญคาร์โบไฮเดรต เช่น น้ำตาล ที่มีอยู่ในขวดหมัก การเพิ่มขึ้นของกรดอินทรีย์ไม่เพียงแต่ช่วยลดค่า pH ของน้ำหมักชีวภาพพลูคาวเท่านั้น แต่ยังมีส่วนช่วยเพิ่มความเสถียรของผลิตภัณฑ์ในระยะยาว โดยสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค และป้องกันการเสื่อมคุณภาพของน้ำหมักชีวภาพพลูคาวในระหว่างการเก็บรักษาได้อย่างมีประสิทธิภาพ **(Table 2)** จากการศึกษาของ Shori (2013) รายงานว่า การเพิ่มขึ้นของกรดอินทรีย์ในกระบวนการหมักมีความสัมพันธ์โดยตรงกับการลดลงของค่า pH และการเพิ่มขึ้นของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยกรดอินทรีย์ที่สะสมในกระบวนการหมักมีบทบาทสำคัญในการเสริมคุณสมบัติทางเคมี ทั้งในด้านการสร้างความเป็นกรดที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษา และการเสริมความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

จากผลการทดลองในการศึกษาระดับของ *L. casei* ร่วมกับ HCP พบว่า ทั้งสองปัจจัยมีบทบาทสำคัญในการปรับปรุงคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของน้ำหมัก โดยระดับที่เหมาะสมของ *L. casei* และผงพลูคาวสามารถเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ในกระบวนการหมัก พร้อมทั้งช่วยเสริมการปลดปล่อยสารฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์จากโครงสร้างของพืช ส่งผลให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ

Table 2 Chemical and physical properties of bio-fermented *Houttuynia cordata* juice as affected by different levels of *Lactobacillus casei* and *Houttuynia cordata* powder

Items	Moisture (%)	pH	Total soluble solids (°Brix)	Total acidity (%)
L. casei 0%				
HCP 10%	96.036^{b}	4.050^{a}	4.200^{f}	0.955^{de}
HCP 12.5%	95.395^{e}	4.050^{a}	4.700^{d}	1.000^{d}
HCP 15%	94.672^{f}	4.100^{a}	5.200^{a}	1.000^{d}
L. casei 1%				
HCP 10%	96.033^{b}	3.400^{c}	4.200^{f}	0.793^{e}
HCP 12.5%	95.747^{cd}	3.550^{b}	4.400^{e}	0.901^{de}
HCP 15%	95.965^{b}	3.400^{c}	4.800^{c}	0.865^{de}
L. casei 10%				
HCP 10%	96.028^{b}	3.350^{c}	4.200^{f}	1.397^{c}
HCP 12.5%	96.284^{a}	3.200^{e}	4.200^{f}	1.261^{c}
HCP 15%	95.610^{d}	3.300^{cd}	5.000^{b}	1.604^{b}
L. casei 20%				
HCP 10%	95.873^{bc}	3.250^{de}	4.400^{e}	1.757^{b}
HCP 12.5%	95.299^{e}	3.350^{c}	5.000^{b}	1.964^{a}
HCP 15%	95.414^{e}	3.400^{c}	5.200^{a}	1.973^{a}
SEM	0.063	0.031	0.017	0.056
L. casei (A)				
0%	95.368^{c}	4.067^{a}	4.700^{b}	0.985^{c}
1%	95.915^{a}	3.450^{b}	4.467^{c}	0.853^{d}
10%	95.974^{a}	3.283^{c}	4.467^{c}	1.421^{b}
20%	95.529^{b}	3.333^{c}	4.867^{a}	1.898^{a}
HCP (B)				
10%	95.993^{a}	3.513	4.250^{c}	1.225^{b}
12.5%	95.681^{b}	3.538	4.575^{b}	1.282^{ab}
15%	95.416^{c}	3.550	5.050^{a}	1.361^{a}
Significance of main effect and interaction				
L. casei (A)	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
HCP (B)	<0.01	0.24	<0.01	<0.05
A*B	<0.01	<0.01	<0.01	<0.05

$^{a–f}$ Means within columns with difference superscript letters differ at (p<0.05). SEM: standard error of the mean.

L. casei: *Lactobacillus casei*. HCP: *Houttuynia cordata* powder

สรุป

การศึกษาผลของระดับ *L. casei* และผงพลูคาวต่อคุณสมบัติทางเคมี กายภาพ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำหมักชีวภาพ โดยพบว่า กลุ่มที่เติม *L. casei* 1% ร่วมกับ HCP 15% ให้ผลดีที่สุดในภาพรวม ซึ่งมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดสูงที่สุด 8.667 × 10^6 CFU/ml แตกต่างจากกลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) นอกจากนี้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากการวัดด้วยวิธี DPPH และ ABTS อยู่ในระดับที่ดี ขณะเดียวกันยังพบปริมาณสารฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และเควอร์ซิทรินในระดับเหมาะสม แสดงถึงประสิทธิภาพของกระบวนการหมักในการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์จากพืชสมุนไพร และส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์

ผลการทดลองแสดงถึงศักยภาพของการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกร่วมกับผงพลูคาวในการพัฒนาน้ำหมักชีวภาพ พลูคาวที่มีคุณสมบัติครบถ้วน ทั้งในด้านจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในด้านสุขภาพและอาหารสัตว์ได้อย่างมีประสิทธิภาพในอนาคต

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) สำหรับเชื้อจุลินทรีย์ ขอขอบคุณสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ (วช.) และโครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม (พวอ.) สัญญาเลขที่ วช.อว.(อ)(กบง)/346/2563 รวมทั้งบริษัทแลนด์เฮิร์บ จำกัด ในการสนับสนุนและส่งเสริมการศึกษาค้นคว้างานวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

จริยา ชมวารินทร์, กัญญลักษณ์ ชัยคาภา และนเรศ วโรภาสตระกูล. 2541. แบคทีเรียวิทยาพื้นฐาน. ขอนแก่น: โรงพิมพ์คลังนานาวิทยา.

ทศพล พลคำมาก, ธีระ ฤทธิรอด และสิรินดา ยุ่นฉลาด. 2559. การเพิ่มฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำพลูคาวด้วยการผสมกับกระชายดำและหมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก. แหล่งข้อมูล: https://ph02.tci-thaijo.org/index.php/gskku/article/view/60981/50228. ค้นเมื่อ 18 กันยายน 2564.

นักสิทธิ์ ปัญโญใหญ่. 2554. ผลของอุณหภูมิอบแห้งต่อฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของสมุนไพรพลูคาว (*Houttuynia cordata* Thunb.). วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 42: 556-558.

บัณฑรวรรณ ธุระพระ, จันทนา บุญยะรัตน์, เยาวเรศ ชูลิขิต และสุภาวดี ดาวดี. 2559. การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในส้มโอ. วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน. 11: 80-91.

ภัททิรา ประสาทแก้ว. 2561. ผลของการเสริมใบพลูคาวต่อภูมิต้านทานโรค การให้ผลผลิต และคุณภาพไข่ของไก่ไข่. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 49: 115-118.

สถาบันวิจัยสมุนไพร. 2546. สมุนไพรน่ารู้: ผักคาวตอง *Houttuynia cordata* Thunb. กรุงเทพฯ: สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข.

วีระกิจ หิรัญวิวัฒน์กุล. 2561. โพรไบโอติกส์. แหล่งข้อมูล: https://www.nonthavej.co.th/Probiotics.php. ค้นเมื่อ 16 กันยายน 2566.

ใจพร พุ่มคำ. 2555. อาหาร (ไม่) ปลอดภัย ผลจากการใช้ยาปฏิชีวนะในสัตว์. แหล่งข้อมูล: https://he01.tci-thaijo.org/index.php/fdajournal/article/view/138475/102928. ค้นเมื่อ 18 กันยายน 2563.

Afsharmanesh, M., and B. Sadaghi. 2014. Effects of dietary alternatives (probiotic, green tea powder, and Kombucha tea) as antimicrobial growth promoters on growth, ileal nutrient digestibility, blood parameters, and immune response of broiler chickens. Comparative Clinical Pathology. 23: 717-724.

AOAC. 1999. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 15th ed. Arlington, VA: Association of Official Analytical Chemists.

AOAC. 2000. Official methods of analysis of AOAC international. Volume 2, 17th ed. AOAC International.

Guo, Y., R. S. Bruno, and M. G. Traber. 2020. Bioavailability of flavonoids: mechanisms, measurement, and implications for nutrition and health. Advances in Nutrition. 11: 398-408.

Filannino, P., G. Cardinali, C. G. Rizzello, S. Buchin, M. De Angelis, M. Gobbetti, and R. Di Cagno. 2014. Metabolic responses of *Lactobacillus plantarum* strains during fermentation and storage of vegetable and fruit juices. Applied and Environmental Microbiology. 80: 2206-2215.

Hatab, S., R. Athanasio, R. Holley, A. Rodas-Gonzalez, and C. Narvaez-Bravo. 2016. Survival and reduction of shiga toxin-producing Escherichia coli in a fresh cold-pressed juice treated with antimicrobial plant extracts. Journal of Food Science. 81: 1987-1995.

Hayashi, K., M. Kamiya, and T. Hayashi. 1995. Virucidal effects of the steam distillate from *Houttuynia cordata* and its components on HSV-1, influenza virus and HIV. Planta Medica. 61: 237-241.

Hur, S. J., S. Y. Lee, Y. C. Kim, I. Choi, and G. B. Kim. 2014. Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. Food Chemistry. 160: 346-356.

Kahn, L. H., G. Bergeron, M. W. Bourassa, B. De Vegt, J. Gill, F. Gomes, and E. Topp. 2019. From farm management to bacteriophage therapy: strategies to reduce antibiotic use in animal agriculture. Annals of the New York Academy of Sciences. 1441: 31-39.

Kwon, E. E., S. Kim, Y. J. Jeon, and H. Yi. 2012. Biodiesel production from sewage sludge: new paradigm for mining energy from municipal hazardous material. Environmental Science and Technology. 46: 10222-10228.

Likhitwitayawuid, K., B. Sritularak, K. Benchanak, V. Lipipun, J. Mathew, and R. F. Schinazi. 2005. Phenolics with antiviral activity from *Millettia erythrocalyx* and *Artocarpus lakoocha*. Natural Product Research. 19: 177-182.

Lilly, D. M., and R. H. Stillwell. 1965. Probiotics. Growth promoting factors produced by micro-organisms. Science. 147: 747-748.

Morita, N., K. Hayashi, A. Fujita, and H. Matsui. 1995. Extraction of antiviral substances from *Houttuynia cordata* Thunb. Chemical Abstracts. 123: article ID 93249.

Mountzouris, K. C., P. Tsitrsikos, I. Palamidi, A. Arvaniti, M. Mohnl, G. Schatzmayr, and K. Fegeros. 2010. Effects of probiotic inclusion levels in broiler nutrition on growth performance, nutrient digestibility, plasma immunoglobulins, and cecal microflora composition. Poultry Science. 89: 58-67.

Pradhan, S., S. Rituparna, H. Dehury, M. Dhall, and Y. D. Singh. 2023. Nutritional profile and pharmacological aspect of *Houttuynia cordata* Thunb. and their therapeutic applications. Pharmacological Research - Modern Chinese Medicine. 9: article ID 100311.

SAS Institute Inc. 1996. SAS/STAT User's Guide. Version 6.12. SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA.

Samchai, S., P. Seephonkai, A. Sangdee, A. Puntumchai, and U. Klinhom. 2009. Antioxidant, cytotoxic and antimalarial activities from crude extracts of mushroom *Phellinus linteus*. Journal of Biological Sciences. 9: 778-783.

Shori, A. B. 2013. Antioxidant activity and viability of lactic acid bacteria in soybean-yogurt made from cow and camel milk. Journal of Taibah University for Science. 7: 202-208.

Wang, Y., Z. Ren, L. Fu, and X. Su. 2016. Two highly adhesive lactic acid bacteria strains are protective in zebrafish infected with Aeromonas hydrophila by evocation of gut mucosal immunity. Journal of Applied Microbiology. 120: 441-451.

Yao, S., H. Yang, M. Zhang, J. Xian, R. Zhou, Y. Jin, J. Huang, and C. Wu. 2024. Sucrose contributed to the biofilm formation of *Tetragenococcus halophilus* and changed the biofilm structure. Food Microbiology. 124: article ID 104616.

Zhishen, J., T. Mengcheng, and W. Jianming. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chemistry. 64: 555-559.