

กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของกระชายขาวที่หมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก

Antioxidant Activities of *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. Fermented with Lactic Acid Bacteria

วันวิสาข์ บุญกล้า¹ อนุศักดิ์ เกิดสิน² และปริญญณ์ อิศรานูวัฒน์^{1*}
Wanwisa Boonkla¹, Anusak Kerdsin² and Pariyaporn Itsaranuwat^{1*}

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของกระชายขาวที่หมักด้วยเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria: LAB) โดยมีปัจจัยที่ศึกษา 2 ปัจจัย ได้แก่ เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก จำนวน 10 สายพันธุ์ ได้แก่ แบคทีเรีย *Lactobacillus pentosus* JM085 *L. pentosus* JM0812 *L. pentosus* UM055 *L. pentosus* UM054 *L. pentosus* YM122 *L. pentosus* VM096 *L. pentosus* DM068 *L. pentosus* VM095 *Enterococcus faecalis* YM126 และ *L. lactis* A7 ระยะเวลาในการหมัก ได้แก่ 0 24 48 และ 72 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่าสายพันธุ์และระยะเวลาในการหมักส่งผลต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical-scavenging assay (DPPH) และ ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อระยะเวลาในการหมักเพิ่มขึ้นส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ โดยกระชายขาวที่หมักด้วยแบคทีเรีย *L. pentosus* DM068 นาน 72 ชั่วโมง มีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH สูงสุดเท่ากับ 83.42 ± 1.30 ไมโครกรัมTrolox ต่อมิลลิกรัม (μg TE/ml) สำหรับค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP พบว่ากระชายขาวที่หมักด้วยแบคทีเรีย *L. pentosus* VM095 นาน 72 ชั่วโมง มีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 295.82 ± 2.15 ไมโครกรัมของเฟอร์รัสต่อมิลลิกรัม (μg Fe(II)/ml) การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่ากระบวนการหมักกระชายขาวด้วยเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถเพิ่มกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์ ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาเพิ่มคุณค่าและมูลค่าของผลิตภัณฑ์สมุนไพรเพื่อประโยชน์ทางอุตสาหกรรมอาหารและทางเภสัชศาสตร์ได้

คำสำคัญ: กระชายขาว แบคทีเรียกรดแลคติก โพรไบโอติก กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ

¹ หน่วยงานวิจัยอุตสาหกรรมชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

² ภาควิชาอนามัยชุมชน คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ

* Corresponding author e-mail: pariyaporn.i@msu.ac.th

DOI: <https://doi.org/10.65217/wichchajinstru.2024.v43i2.260335>

Received: 8 September 2023, Revised: 20 September 2023, Accepted: 21 September 2023

Abstract

This research aimed to study the antioxidant activities of *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf., known as fingerroot, fermented with probiotic lactic acid bacteria (LAB). Ten strains of lactic acid bacteria including *Lactobacillus pentosus* JM085, *L. pentosus* JM0812, *L. pentosus* UM055, *L. pentosus* UM054, *L. pentosus* YM122, *L. pentosus* VM096, *L. pentosus* DM068, *L. pentosus* VM095, *Enterococcus faecalis* YM126, and *L. lactis* A7 were used as starter culture for *B. rotunda* (L.) Mansf. Fermentation was at 0, 24, 48, and 72 hours. The results showed that the antioxidant activities depended on strains and fermentation time. The antioxidant capacity of fermented *B. rotunda* extract increased significantly ($p \leq 0.05$) when fermentation time increased, using DPPH radical-scavenging assay (DPPH) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay. The strongest DPPH scavenging capacity was observed in the sample fermented with *L. pentosus* DM068 at 72 hours ($83.42 \pm 1.30 \mu\text{g TE/ml}$), while FRAP reported in *L. pentosus* VM095, at 72 hours ($295.82 \pm 2.15 \mu\text{g Fe(II)/ml}$). In conclusion, probiotic lactic acid bacteria fermentation increased the antioxidant activities of *B. rotunda* extract. Applying the fermentation process for value addition in the food and pharmaceutical industries might be interesting.

Keywords: *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf., Lactic acid bacteria, Probiotics, Antioxidant activity

บทนำ

การใช้พืชสมุนไพรในการรักษาโรคมีประวัติมาอย่างยาวนานในพื้นที่ต่าง ๆ ทั่วโลก สมุนไพร มีสรรพคุณทางยาหรือใช้ในการรักษาโรค เนื่องจากสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) หรือสารพฤกษเคมี (phytochemical) ในสมุนไพรเหล่านั้นมีฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างใดอย่างหนึ่งหรือ ต่ออาการของโรค สมุนไพรหลายชนิดมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant properties) มีกิจกรรมการต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial activities) เนื่องจากมีองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น สารประกอบกลุ่มฟีนอลิกหรือฟลาโวนอยด์ (Pesewu *et al.*, 2008)

กระชายขาวเป็นพืชในวงศ์ Zingiberaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. (Chong *et al.*, 2011; Jing *et al.*, 2010; Yusuf *et al.*, 2013) เป็นพืชสมุนไพรไทยและเป็นเครื่องเทศที่สำคัญที่นำมาประกอบอาหาร และส่วนที่นำมาใช้ประโยชน์ คือ เหง้าหรือราก (rhizomes) เหง้าของกระชายขาวถูกนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์แผนโบราณ โดยนำมารักษาโรค อักเสบ (เช่น ฟันผุ โรคผิวหนัง ไอแห้ง และหวัด) (Chuakul and Boonpleng, 2003; Salguero, 2003) ผลในกระเพาะอาหารและฆ่าพยาธิ (Riswan and Sangat-Roemantyo, 2002) ในเหง้าของกระชายขาวมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เป็นสารทุติยภูมิของพืชหลายชนิด เช่น อนุพันธ์ฟลาโวนอยด์

น้ำมันหอมระเหย และสารประกอบโพลีฟีนอล (Tang *et al.*, 2007; Morikawa *et al.*, 2008; Yusuf *et al.*, 2013; Baharudin *et al.*, 2015; Jing *et al.*, 2010) ในปัจจุบันมีการใช้กระชายขาวเป็นสมุนไพรที่มีฤทธิ์ทางยาหรือส่งเสริมสุขภาพอย่างแพร่หลาย และมีงานวิจัยหลายฉบับพบว่ากระชายขาวมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

แบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria: LAB) เช่น *Lactobacillus acidophilus* *L. pentosus* *Enterococcus faecalis* และ *Bifidobacterium* เป็นแบคทีเรียที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพของมนุษย์และสัตว์ โดยเฉพาะสายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก (probiotic) คำว่า โพรไบโอติก มีรากศัพท์ดั้งเดิมมาจากภาษากรีก แปลว่า “for life” หรือ “เพื่อชีวิต” หมายถึง แบคทีเรียที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย ช่วยปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร รักษาอาการท้องร่วง และมีคุณสมบัติทางอายุรเวท (therapeutic properties) เช่น ช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันโรค ลดปริมาณคอเลสเตอรอลในเส้นเลือด ป้องกันการเกิดโรคมะเร็ง เป็นต้น (Fooks *et al.*, 1999; Itsaranuwat *et al.*, 2003) มีรายงานหลายฉบับ พบว่าแบคทีเรียกลุ่มแลคติกสามารถยับยั้งเชื้อโรคในทางเดินอาหาร การผลิตสารต้านจุลชีพ การเพิ่มการตอบสนองของภูมิคุ้มกัน การปรับปรุงการเผาผลาญแลคโตส และการป้องกันมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ดี (Kechagia *et al.*, 2013) แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกนี้สามารถผลิตสารประกอบที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียหรือจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ได้หลายชนิด เช่น กรดอินทรีย์ (organic acid) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) ไดอะซีทิล (diacetyl) อะซีตัลดีไฮด์ (acetaldehyde) แบคทีริโอซิน (bacteriocins) นอกจากนี้กระบวนการหมักยังอาจส่งเสริมการเพิ่มสารสำคัญในผลิตภัณฑ์และทำให้เกิดกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นด้วย (ลัญจกรและคณะ, 2559)

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของกระชายขาวหมักร่วมกับแบคทีเรียกรดแลคติก โดยใช้แบคทีเรียกลุ่มผลิตกรดแลคติก 10 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ผ่านการศึกษาคูณสมบัติการเป็นโพรไบโอติก ได้แก่ *L. pentosus* JM085 *L. pentosus* JM0812 *L. pentosus* UM055 *L. pentosus* UM054 *L. pentosus* YM122 *L. pentosus* VM096 *L. pentosus* DM068 *L. pentosus* VM095 *E. faecalis* YM126 และ *L. lactis* A7 โดยการศึกษาที่ระยะเวลาในการหมักต่าง ๆ

วิธีดำเนินการวิจัย

1. แบคทีเรียกรดแลคติกที่ใช้ในงานวิจัย

แบคทีเรียกลุ่มผลิตกรดแลคติกจำนวน 10 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. pentosus* JM085 *L. pentosus* JM0812 *L. pentosus* UM055 *L. pentosus* UM054 *L. pentosus* YM122 *L. pentosus* VM096 *L. pentosus* DM068 *L. pentosus* VM095 *E. faecalis* YM126 และ *L. lactis* A7 โดยแบคทีเรียกลุ่มผลิตกรดแลคติกทั้ง 10 สายพันธุ์ ผ่านการทดสอบคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติก ซึ่งได้รับอนุเคราะห์จากหน่วยวิจัยทาง การแปรรูปชีวมวลด้วยกระบวนการทางกายภาพ/เคมี/ชีวภาพ และอาหารเสริมสุขภาพ (biorefinery and functional food research unit: BIOF) ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

2. การเตรียมสมุนไพร

ผงกระชายขาวได้จากร้านทองอินทร์เภสัช ถนนสมณวิมลราชบุรี ตำบลตลาด อำเภอเมืองมหาสารคาม จังหวัดมหาสารคาม เก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิห้องก่อนจะทำการสกัดต่อไป

สำหรับการเตรียมสารสกัดเพื่อเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการสกัดกระชายขาวด้วยน้ำกลั่น โดยใช้สัดส่วนผงกระชายขาวร้อยละ 5 และน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (%w/v) ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เป็น 6.5 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 0.01 โมลาร์ (M) เพื่อให้ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย แล้วนำไปพาสเจอร์ไรซ์ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นก่อนนำไปใช้งาน

3. การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย

โดยนำแบคทีเรียกลุ่มผลิตภัณฑ์ทั้ง 10 สายพันธุ์ มาเพาะเลี้ยงเป็นหัวเชื้อเริ่มต้น โดยใช้เชื้อสต็อกแช่แข็ง (-50 องศาเซลเซียส) ต่อเชื้อลงในอาหารเหลว De Man Rogosa and Sharpe broth (MRS broth) 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงเทียบเท่ากับค่ามาตรฐาน Mcfarland 0.5 โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ซึ่งจะได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.08-0.10 ก่อนที่จะถ่ายลงหัวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5 โดยปริมาตรต่อปริมาตร (%v/v) ในสารสกัดกระชายขาวที่สกัดด้วยน้ำกลั่น ประกอบด้วย ผงกระชายขาวร้อยละ 5 และน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 2 ปรับให้ค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 6.5 และผ่านพาสเจอร์ไรซ์ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 5 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก ๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 0 24 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ

4. การวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ

4.1 วิธี 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH radical scavenging activity)

ดัดแปลงจากวิธีการของ Zhang *et al.* (2016) โดยปิเปตตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร ลงในเพลต 96 หลุม จากนั้นเติมสาร 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical ที่มี ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ (mM) ละลายในเมทานอลปริมาตร 180 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องอ่านถาดไมโครเพลต โดยค่าที่ได้จะถูกคำนวณค่า DPPH radical scavenging activity แสดงในหน่วยไมโครกรัม ไทรอล็อกซ์ต่อมิลลิลิตร ($\mu\text{g TE/ml}$) โดยใช้กราฟมาตรฐานของสารไทรอล็อกซ์ และทำการทดลอง 3 ซ้ำ

4.2 วิธี ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay

ดัดแปลงจากวิธีการของ Bakar *et al.* (2009) โดยเตรียมสารละลาย FRAP (ferric reducing antioxidant power) reagent โดยผสมสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ (acetate buffer) (ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 3.6) 300 มิลลิโมลาร์ กับสารละลาย 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-1,3,5-triazine (TPTZ) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ (ferric chloride solution) 20 มิลลิโมลาร์ ให้เข้ากัน เก็บโดยปราศจากแสง จากนั้นทำการปิเปตตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย FRAP ปริมาตร 180 ไมโครลิตร ลงในเพลต 96 หลุม ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร (microplate reader spectrophotometer) คำนวณค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระในหน่วยไมโครกรัมเฟอร์รัส

ต่อมิลลิลิตร ($\mu\text{g Fe(II)/ml}$) โดยใช้กราฟมาตรฐานของสารเฟอร์รัสซัลเฟต (FeSO_4) และทำการทดลอง 3 ซ้ำ

5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

สถิติพื้นฐาน ได้แก่ ร้อยละ ค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน การวิเคราะห์หาข้อมูลเพื่อทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรม SPSS version 20 สถิติที่ใช้ คือ การวิเคราะห์ความแปรปรวนสำหรับการทดลองแฟกทอเรียล (Factorial experiment in CRD by Univariate) ที่มี 2 ปัจจัย และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยตามวิธีของ Duncan multiple's range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

ผลการวิจัย

1. กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay และ FRAP assay

จากการศึกษาผลของการหมักสารสกัดกระชายขาวด้วยเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 10 สายพันธุ์ โดยมีปัจจัยที่ศึกษา 2 ปัจจัย ได้แก่ สายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก และระยะเวลาในการหมักที่มีผลต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ผลการทดลองพบว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay และวิธี FRAP assay เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงดังตารางที่ 1 และ 2 จะเห็นว่าเมื่อระยะเวลาในการหมักเพิ่มขึ้นส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของการยับยั้งกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อเปรียบเทียบสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก พบว่าสารสกัดกระชายขาวที่หมักด้วยแบคทีเรีย *L. pentosus* DM068 ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง ส่งผลต่อกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay สูงที่สุดเท่ากับ 83.42 ± 1.30 ไมโครกรัมTroloxต่อมิลลิลิตร และพบว่าสารสกัดกระชายขาวที่หมักด้วยแบคทีเรีย *L. pentosus* VM095 ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง ส่งผลต่อกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระสูงด้วยวิธี FRAP assay สูงที่สุดเท่ากับ 295.82 ± 2.15 ไมโครกรัมเฟอร์รัสต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ตารางที่ 1 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของกระชายขาวที่หมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกด้วยวิธี DPPH assay

จุลินทรีย์กรดแลคติก (LAB microorganisms)	กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay (ไมโครกรัมTroloxต่อมิลลิลิตร)			
	0 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
<i>L. pentosus</i> JM085	$22.04 \pm 5.24^{c,D}$	$41.23 \pm 4.84^{c,C}$	$56.13 \pm 3.96^{c,B}$	$69.92 \pm 1.04^{c,A}$
<i>L. pentosus</i> JM0812	$22.36 \pm 11.13^{c,D}$	$38.18 \pm 8.59^{c,C}$	$60.45 \pm 6.35^{c,B}$	$71.45 \pm 0.95^{c,A}$
<i>L. pentosus</i> UM055	$26.27 \pm 1.13^{c,D}$	$54.20 \pm 3.16^{c,C}$	$57.89 \pm 7.05^{c,B}$	$72.70 \pm 2.27^{cd,A}$
<i>L. pentosus</i> UM054	$21.81 \pm 1.23^{c,D}$	$37.30 \pm 0.79^{c,C}$	$55.00 \pm 3.51^{c,B}$	$75.54 \pm 0.45^{c,A}$
<i>L. pentosus</i> YM122	$20.69 \pm 7.26^{bc,D}$	$57.90 \pm 4.85^{bc,C}$	$63.28 \pm 4.77^{bc,B}$	$73.49 \pm 2.66^{bc,A}$
<i>L. pentosus</i> VM096	$20.28 \pm 2.22^{d,D}$	$42.35 \pm 7.48^{d,C}$	$61.01 \pm 6.18^{d,B}$	$71.34 \pm 0.68^{d,A}$
<i>L. pentosus</i> DM068	$25.62 \pm 5.71^{a,D}$	$57.37 \pm 1.17^{a,C}$	$72.64 \pm 2.50^{a,B}$	$83.42 \pm 1.30^{a,A}$
<i>L. pentosus</i> VM095	$25.27 \pm 2.21^{d,D}$	$19.52 \pm 3.23^{d,C}$	$40.82 \pm 7.66^{d,B}$	$66.29 \pm 0.87^{d,A}$
<i>E. faecalis</i> YM126	$22.63 \pm 6.30^{ab,D}$	$53.62 \pm 7.53^{ab,C}$	$73.15 \pm 4.30^{ab,B}$	$78.83 \pm 2.58^{ab,A}$
<i>L. lactis</i> A7	$21.63 \pm 1.98^{cd,D}$	$48.39 \pm 0.79^{cd,C}$	$57.72 \pm 3.00^{cd,B}$	$73.27 \pm 1.70^{cd,A}$

หมายเหตุ: - ตัวอักษร A B C D ที่แตกต่างกัน หมายถึง ในข้อมูลคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)
 - ตัวอักษร a b c d ที่แตกต่างกัน หมายถึง ในข้อมูลแถวเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 2ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของกระชายขาวที่หมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกด้วย วิธี FRAP assays

จุลินทรีย์กรดแลคติก (LAB Microorganisms)	กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี FRAP assays (ไมโครกรัมเฟอรรัสต่อมิลลิลิตร)			
	0 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	0 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
<i>L. pentosus</i> JM085	220.12±1.42 ^{d,D}	237.57±3.82 ^{d,C}	268.00±0.29 ^{d,B}	276.33±0.76 ^{d,A}
<i>L. pentosus</i> JM0812	219.04±4.66 ^{d,D}	240.86±5.12 ^{d,C}	266.29±0.52 ^{d,B}	277.14±0.31 ^{d,A}
<i>L. pentosus</i> UM055	224.58±1.63 ^{cd,D}	232.45±2.73 ^{cd,C}	267.02±0.31 ^{cd,B}	289.50±0.52 ^{cd,A}
<i>L. pentosus</i> UM054	230.24±5.46 ^{d,D}	227.76±3.06 ^{d,C}	263.57±0.44 ^{d,B}	281.02±0.86 ^{d,A}
<i>L. pentosus</i> YM122	235.32±2.49 ^{d,D}	216.71±5.50 ^{d,C}	270.24±0.86 ^{d,B}	284.19±1.30 ^{d,A}
<i>L. pentosus</i> VM096	231.33±2.22 ^{cd,D}	221.29±4.33 ^{cd,C}	266.25±0.29 ^{cd,B}	289.97±0.60 ^{cd,A}
<i>L. pentosus</i> DM068	225.51±2.44 ^{c,C}	238.69±5.39 ^{c,D}	267.49±0.53 ^{c,B}	284.19±2.56 ^{c,A}
<i>L. pentosus</i> VM095	227.49±10.19 ^{a,A}	255.51±2.66 ^{a,A}	274.23±0.47 ^{a,A}	295.82±2.15 ^{a,A}
<i>E. faecalis</i> YM126	235.55±5.51 ^{b,D}	245.05±2.68 ^{b,C}	269.27±0.66 ^{b,B}	284.97±1.23 ^{b,A}
<i>L. lactis</i> A7	229.93±3.14 ^{d,D}	228.50±8.59 ^{d,C}	263.88±0.53 ^{d,B}	277.84±0.65 ^{d,A}

หมายเหตุ: - ตัวอักษร A B C D ที่แตกต่างกัน หมายถึง ในข้อมูลคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)
 - ตัวอักษร a b c d ที่แตกต่างกัน หมายถึง ในข้อมูลแถวเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

การอภิปรายผลการวิจัย

จากการศึกษากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกระชายขาวที่หมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกโดยวิธี DPPH assay ซึ่งหลักการ คือ การทดสอบคุณสมบัติในการเป็นตัวขจัดอนุมูลอิสระ (free radical scavenger) และวิธี FRAP assay ซึ่งหลักการ คือ การศึกษาคุณสมบัติในการเป็นตัวให้อิเล็กตรอนให้แก่อนุมูลอิสระ พบว่าหลังจากการหมักน้ำหมักกระชายขาวด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากในกระบวนการหมักจะทำให้ปริมาณกรดอินทรีย์เพิ่มขึ้นจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักส่งผลให้เสริมฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้น และส่งผลให้มีฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Shori (2013) ที่ศึกษาปริมาณกรดอินทรีย์ในนมวัวหมักที่หมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก พบว่าเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างลดลง ปริมาณกรดทั้งหมดและกรดอินทรีย์สูงขึ้นจะช่วยเสริมฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ นอกจากนี้ในกระบวนการหมักสมุนไพรยังส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น สารกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ ที่ส่งเสริมกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของน้ำหมักสมุนไพรต่าง ๆ จากการศึกษา ก่อนหน้านั้นของทศพล และคณะ (2559) ศึกษาการเพิ่มฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำพริกด้วยวิธีการผสม

กับกระชายดำและหมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก พบว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay ของน้ำหมักพุลูควาที่ไม่มีการเติมกระชายดำแต่มีการเติมกล่ำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก และมีการเติมน้ำอ้อยลงไป มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay เท่ากับ 271.57 ไมโครโมลต่อลิตร ($\mu\text{mol/L}$) ซึ่งเพิ่มมากขึ้นกว่า 3.5 เท่าของน้ำหมักพุลูควาที่ไม่มีการเติมกล่ำเชื้อและน้ำอ้อย และเมื่อน้ำหมักพุลูควาด้วยการผสมกับกระชายดำหมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกและเติมน้ำอ้อย พบว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay เท่ากับ 891.0 ไมโครโมลต่อลิตร ซึ่งพบว่าสูงกว่า 78.71 ไมโครโมลต่อลิตร ที่ได้จากการหมักที่ใช้ น้ำหมักพุลูควาเพียงอย่างเดียว จะเห็นว่ากระชายดำมีผลโดยตรงต่อการเพิ่มฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay ของน้ำหมักพุลูควา แต่ไม่มีผลเพิ่มปริมาณของกรดแลคติกและกรดอะซิติก ยิ่งไปกว่านั้นพบว่าปริมาณของกรดอินทรีย์จากแบคทีเรียกรดแลคติกที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักมีผลเสริมให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้น มีการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Chaiyasut *et al.* (2011) ทำการศึกษาสมุนไพรไทย 5 ชนิด ได้แก่ พุลูควา มะขามป้อม ลูกยอ สมอไทย และกระชายดำ หมักรวมกันโดยใช้กล่ำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก พบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้นเท่ากับ 31.31 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อมิลลิลิตร (mg GAE/ml) การศึกษาของ Sawangwan *et al.* (2021) ทำการศึกษาด้านอนุมูลอิสระจากการหมักรำข้าวโดยแบคทีเรียกรดแลคติก พบว่าสารสกัดรำข้าวที่มีการหมักแบบสถานะของแข็ง (SSF) ของแบคทีเรียแลคติกทั้งสองสายพันธุ์มีปริมาณฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดรำข้าวที่ไม่มีการหมักแบบของแข็ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารสกัดข้าวบาหนัหน้าที่มีความชื้นร้อยละ 50 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดย *L. plantarum* ที่เวลา 48 ชั่วโมง แสดงค่าสารประกอบฟีนอลิกสูงสุด (2.85 ± 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (mg/ml)) เช่นเดียวกับร้อยละที่ดีที่สุดของสารต้านอนุมูลอิสระที่พบในสารสกัดรำข้าวหมักที่มีความชื้นร้อยละ 50 โดย *L. casei* ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง (ดอกมะลิไทยร้อยละ 78.79 และข้าวบ้านหน้าร้อยละ 78.49)

สรุปผลการวิจัย

การศึกษากการส่งเสริมกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกระชายขาวที่หมักด้วยเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก 10 สายพันธุ์ พบว่าสายพันธุ์ของเชื้อเริ่มต้น (starter culture) และระยะเวลาในการหมักส่งผลต่อการเพิ่มฤทธิ์ทางชีวภาพและกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของน้ำหมักกระชายขาวได้ ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 10 สายพันธุ์ ให้ฤทธิ์ทางชีวภาพและกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และเมื่อระยะเวลาในการหมักเพิ่มขึ้นส่งผลต่อค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นด้วย งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยที่ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดกระชายขาวหมักที่ใช้เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์แตกต่างกันที่ผ่านการศึกษาคุนสมบัติการเป็นโปรไบโอติก เพื่อเพิ่มคุณค่าทางสารอาหาร เครื่องดื่ม ทางยา และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูง เพื่อเพิ่มมูลค่าให้กับผลิตภัณฑ์และน้ำหมักที่ผลิตได้จะนำไปต่อยอดเกี่ยวกับกลไกการต้านแบคทีเรียก่อโรค เพื่อเป็นประโยชน์ในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์บรรเทาอาการอักเสบ การผลิตกรดของแบคทีเรียในระหว่างการหมัก สารต้านอนุมูลอิสระ และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เพิ่มขึ้นจะช่วยให้การยับยั้งการต้านแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการอักเสบได้ ซึ่งจะช่วยพัฒนาผลิตภัณฑ์จากพืชสมุนไพรร่วมกับการเสริมฤทธิ์ของแบคทีเรียในการบรรเทาอาการอักเสบต่อไป

แนวทางในการศึกษาต่อยอดจากงานวิจัย คือ การศึกษาปริมาณสารสำคัญและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compounds) เช่น สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic compounds) สารประกอบฟลาโวนอยด์ (total flavonoid compounds) และการศึกษากิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ (antimicrobial activity) เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำสารสกัดกระชายขาวที่หมักด้วยเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกไปใช้ประโยชน์ทางอุตสาหกรรมอาหารและทางเภสัชศาสตร์ในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ สำหรับ “ทุนสนับสนุนการวิจัย ประเภทบัณฑิตศึกษา ประจำปี พ.ศ. 2562” ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยมหาสารคาม สำหรับทุนสนับสนุนการวิจัย และขอขอบคุณภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม สำหรับการสนับสนุนเครื่องมือและห้องปฏิบัติการจนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงตามวัตถุประสงค์

เอกสารอ้างอิง

- ทศพล พลคำมาก อีระ ฤทธิรอด และสิรินดา ยุ่นฉลาด. (2559). การเพิ่มฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำพลูควด้วยการผสมกับกระชายดำและหมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก. *วารสารวิจัย มช.* (ฉบับบัณฑิตศึกษา), 16(1), 64-76.
- ลัญจกร จันทร์อุดม นุชวรา องศาธา ดาวีณาณ์ ยี่ละ และสุไรดา มามะแตหะ. (2559). การเปลี่ยนแปลงทางเคมีและจุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์ปอเยาะทุเรียนระหว่างการหมัก, *วารสารวิชา มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช*, 35(2), 1-15.
- Baharudin, M.K.A., Hamid, S.A. and Susanti, D. (2015). Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from three aromatic plants of the Zingiberaceae family in Malaysia. *Journal of Physical Science*, 26(1), 71-81.
- Bakar, M.F.A., Mohamed, M., Rahmat, A. and Fry, J. (2009). Phytochemicals and antioxidant activity of different parts of bambangan (*Mangifera pajang*) and tarap (*Artocarpus odoratissimus*). *Food Chemistry*, 113(2), 479-483, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.081>.
- Chaiyasut, C., Kusirisin, W., Lailerd, N., Lerttrakarnnon, P., Suttajit, M. and Srichairatanakool, S. (2011). Effects of phenolic compounds of fermented Thai indigenous plants on oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011, doi: <https://doi.org/10.1155/2011/749307>.
- Ching, A.Y.L., Wah, T.S., Sukari, M.A., Lian, G.E.C., Rahmani, M. and Khalid, K. (2007). Characterization of flavonoid derivatives from *Boesenbergia rotunda* (L.). *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 11(1), 154-159.

- Chong, T.E., Teck, F.G., Ming, W.S., Rahman, N.A., Khalid, N., Karsani, S.A. and Yusof, R. (2011). Optimization of two-dimensional gel electrophoresis protocols for *Boesenbergia rotunda* in vitro suspension culture. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(16), 3777-3780.
- Chuakul, W. and Boonpleng, A. (2003). Ethnomedical uses of Thai Zingiberaceous plant. *Journal Medicine*, 10(1), 33-39.
- Fooks, L.J., Fuller, R. and Gibson, G.R. (1999) Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. *International Dairy Journal*, 9(1), 53-61, doi: [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(99\)00044-8](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(99)00044-8).
- Itsaranuwat, P., Al-Haddad, K.S.H. and Robinson, R.K. (2003). The potential therapeutic benefits of consuming 'health-promoting' fermented dairy products: A brief update. *International Journal of Dairy Technology*, 56(4), 203-210, doi: <https://doi.org/10.1046/j.1471-0307.2003.00106.x>.
- Jing, L.J., Bakar, M.F.A., Mohamed, M. and Rahmat, A. (2010). Effects of selected *Boesenbergia* species on the proliferation of several cancer cell lines. *Journal of Pharmacology and Toxicology*, 6(3), 272-282, doi: <https://doi.org/10.3923/jpt.2011.272.282>.
- Kechagia, M., Basoulis, D., Konstantopoulou, S., Dimitriadi, D., Gyftopoulou, K., Skarmoutsou, N. and Fakiri, E.M. (2013). Health benefits of probiotics: A review. *International Scholarly Research Notices*, 2013, doi: <https://doi.org/10.5402/2013/481651>.
- Morikawa, T., Funakoshi, K., Ninomiya, K., Yasuda, D., Miyagawa, K., Matsuda, H. and Yoshikawa, M. (2008). Medicinal foodstuffs. XXXIV. structures of new prenylchalcones and prenylflavanones with TNF- α and aminopeptidase N inhibitory activities from *Boesenbergia rotunda*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 56(7), 956-962, doi: <https://doi.org/10.1248/cpb.56.956>.
- Pesewu, G.A., Cutler, R.R. and Humber, D.P. (2008). Antibacterial activity of plants used in traditional medicines of Ghana with particular reference to MRSA. *Journal of Ethnopharmacology*, 116(1), 102-111, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.11.005>.
- Riswan, S. and Sangat-Roemantyo, H. (2002). Jamu as traditional medicine in java, Indonesia. *South Pacific Study*, 23(1), 1-10.
- Salguero, C.P. (2003). *A Thai herbal: Traditional recipes for health and harmony*. Retrieved 4 June 2024, from: https://thaihealingalliance.com/wp-content/uploads/The_Theory_of_Royal_Thai_medicine.pdf.

- Sawangwan, T., Porncharoennop, C. and Nimraksa, H. (2021). Antioxidant compounds from rice bran fermentation by lactic acid bacteria. *AIMS Agriculture and Food*, 6(2), 578-587, doi: <https://doi.org/10.3934/agrfood.2021034>.
- 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(4), 202-208, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jtusci.2013.06.003>.
- Yusuf, N.A., Annuar, M.S.M. and Khalid, N. (2013). Existence of bioactive flavonoids in rhizomes and plant cell cultures of *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. Kulturpfl. *Australian Journal of Crop Science*, 7(6), 730-734.
- Zhang, L., Tu, Z.C., Yuan, T., Wang, H., Xie, X. and Fu, Z.F. (2016). Antioxidants and α -glucosidase inhibitors from *Ipomoea batatas* leaves identified by bioassay-guided approach and structure-activity relationships. *Food Chemistry*, 208, 61-67, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.079>.