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

วันวิสาข์ บุญกล้า[1] อนุศักดิ์ เกิดสิน[2] และปริยาภรณ์ อิศรานุวัฒน์[1*]
Wanwisa Boonkla[1], Anusak Kerdsin[2] 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 ไมโครกรัมโทรล็อกซ์ต่อมิลลิลิตร (µg TE/ml) สำหรับค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP พบว่ากระชายขาวที่หมักด้วยแบคทีเรีย *L. pentosus* VM095 นาน 72 ชั่วโมง มีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 295.82±2.15 ไมโครกรัมของเฟอร์รัสต่อมิลลิลิตร (µg Fe(II)/ml) การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่ากระบวนการหมักกระชายขาวด้วยเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถเพิ่มกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์ ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาเพิ่มคุณค่าและมูลค่าของผลิตภัณฑ์สมุนไพรเพื่อประโยชน์ทางอุตสาหกรรมอาหารและทางเภสัชศาสตร์ได้

คำสำคัญ: กระชายขาว แบคทีเรียกรดแลคติก โพรไบโอติก กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ

[1] หน่วยวิจัยอุตสาหกรรมชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
[2] ภาควิชาอนามัยชุมชน คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ
[*] Corresponding author e-mail: pariyaporn.i@msu.ac.th

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±1.30 µg TE/ml), while FRAP reported in *L. pentosus* VM095, at 72 hours (295.82±2.15 µg 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 สมุนไพรมีสรรพคุณทางยาหรือใช้ในการรักษาโรค เนื่องจากสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) หรือสารพฤกษเคมี (phytochemical) ในสมุนไพรเหล่านั้นมีฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างใดอย่างหนึ่งหรือต่ออาการของโรค 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 โดยนำมารักษาโรคอักเสบ (เช่น ฟันผุ โรคผิวหนัง ไอแห้ง และหวัด) (Chuakul and Boonpleng, 2003; Salguero, 2003) แผลในกระเพาะอาหารและฆ่าพยาธิ (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 มีรากศัพท์ดังเดิมมาจากภาษากรีก 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 (hydrogenperoxide) ไดอะซิติล (diacetyl) อะซิตัลดีไฮด์ (acetaldehyde) แบคเทอริโอซิน (bacteriocins) นอกจากนี้กระบวนการหมักยังอาจส่งเสริมการเพิ่มสารสำคัญในผลิตภัณฑ์และทำให้กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นด้วย (ลัญจกร และคณะ, 2559)

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของกระชายขาวหมักร่วมกับแบคทีเรียกรดแลคติก โดยใช้แบคทีเรียกลุ่มผลิตกรดแลคติก 10 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ผ่านการศึกษาคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติก 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/ชีวภาพและอาหารเสริมสุขภาพ (biorefinery and functional food research unit: BIOF) ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

2. การเตรียมสมุนไพร

ผงกระชายขาวได้จากร้านทองอินทร์เภสัช ถนนสมถวิลราษฎร์ 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

โดยนำแบคทีเรียกลุ่มผลิตกรดแลคติกทั้ง 10 สายพันธุ์ มาเพาะเลี้ยงเป็นหัวเชื้อเริ่มต้น โดยใช้เชื้อสต็อกแช่แข็ง (-50 องศาเซลเซียส) ต่อเชื้อลงในอาหารเหลว De Man Rogosa and Sharpe broth (MRS broth) 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงเทียบเท่าค่ามาตรฐาน 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 ที่มีความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ (mM) ละลายในเมทานอลปริมาตร 180 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องอ่านถาดไมโครเพลท โดยค่าที่ได้จะถูกคำนวณค่า DPPH radical scavenging activity แสดงในหน่วยไมโครกรัมโทรล็อกซ์ต่อมิลลิลิตร (µg TE/ml) โดยใช้กราฟมาตรฐานของสารโทรล็อกซ์ และทำการทดลอง 3 ซ้ำ

4.2 วิธี ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay

ดัดแปลงจากวิธีการของ Bakar *et al.* (2009) โดยเตรียมสารละลาย FRAP (ferric reducing antioxidant power) reagent โดยผสมสารละลายอะซีเตทบัฟเฟอร์ (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 (µg 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 ไมโครกรัมโทรล็อกซ์ต่อมิลลิลิตร 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 (ไมโครกรัมโทรล็อกซ์ต่อมิลลิลิตร)			
	0 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
L. pentosus JM085	22.04±5.24^{c,D}	41.23±4.84^{c,C}	56.13±3.96^{c,B}	69.92±1.04^{c,A}
L. pentosus JM0812	22.36±11.13^{c,D}	38.18±8.59^{c,C}	60.45±6.35^{c,B}	71.45±0.95^{c,A}
L. pentosus UM055	26.27±1.13^{c,D}	54.20±3.16^{c,C}	57.89±7.05^{c,B}	72.70±2.27^{cd,A}
L. pentosus UM054	21.81±1.23^{c,D}	37.30±0.79^{c,C}	55.00±3.51^{c,B}	75.54±0.45^{c,A}
L. pentosus YM122	20.69±7.26^{bc,D}	57.90±4.85^{bc,C}	63.28±4.77^{bc,B}	73.49±2.66^{bc,A}
L. pentosus VM096	20.28±2.22^{d,D}	42.35±7.48^{d,C}	61.01±6.18^{d,B}	71.34±0.68^{d,A}
L. pentosus DM068	25.62±5.71^{a,D}	57.37±1.17^{a,C}	72.64±2.50^{a,B}	83.42±1.30^{a,A}
L. pentosus VM095	25.27±2.21^{d,D}	19.52±3.23^{d,C}	40.82±7.66^{d,B}	66.29±0.87^{d,A}
E. faecalis YM126	22.63±6.30^{ab,D}	53.62±7.53^{ab,C}	73.15±4.30^{ab,B}	78.83±2.58^{ab,A}
L. lactis A7	21.63±1.98^{cd,D}	48.39±0.79^{cd,C}	57.72±3.00^{cd,B}	73.27±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 2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของกระชายขาวที่หมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกด้วย วิธี FRAP assays

จุลินทรีย์กรดแลคติก (LAB Microorganisms)	กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี FRAP assays (ไมโครกรัมเฟอร์รัสต่อมิลลิลิตร)			
	0 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	0 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
L. pentosus JM085	$220.12\pm1.42^{d,D}$	$237.57\pm3.82^{d,C}$	$268.00\pm0.29^{d,B}$	$276.33\pm0.76^{d,A}$
L. pentosus JM0812	$219.04\pm4.66^{d,D}$	$240.86\pm5.12^{d,C}$	$266.29\pm0.52^{d,B}$	$277.14\pm0.31^{d,A}$
L. pentosus UM055	$224.58\pm1.63^{cd,D}$	$232.45\pm2.73^{cd,C}$	$267.02\pm0.31^{cd,B}$	$289.50\pm0.52^{cd,A}$
L. pentosus UM054	$230.24\pm5.46^{d,D}$	$227.76\pm3.06^{d,C}$	$263.57\pm0.44^{d,B}$	$281.02\pm0.86^{d,A}$
L. pentosus YM122	$235.32\pm2.49^{d,D}$	$216.71\pm5.50^{d,C}$	$270.24\pm0.86^{d,B}$	$284.19\pm1.30^{d,A}$
L. pentosus VM096	$231.33\pm2.22^{cd,D}$	$221.29\pm4.33^{cd,C}$	$266.25\pm0.29^{cd,B}$	$289.97\pm0.60^{cd,A}$
L. pentosus DM068	$225.51\pm2.44^{c,C}$	$238.69\pm5.39^{c,D}$	$267.49\pm0.53^{c,B}$	$284.19\pm2.56^{c,A}$
L. pentosus VM095	$227.49\pm10.19^{a,A}$	$255.51\pm2.66^{a,A}$	$274.23\pm0.47^{a,A}$	$295.82\pm2.15^{a,A}$
E. faecalis YM126	$235.55\pm5.51^{b,D}$	$245.05\pm2.68^{b,C}$	$269.27\pm0.66^{b,B}$	$284.97\pm1.23^{b,A}$
L. lactis A7	$229.93\pm3.14^{d,D}$	$228.50\pm8.59^{d,C}$	$263.88\pm0.53^{d,B}$	$277.84\pm0.65^{d,A}$

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 พบว่าหลังจากการหมักน้ำหมักกระชายขาวด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากในกระบวนการหมักจะทำให้ปริมาณกรดอินทรีย์เพิ่มขึ้นจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักส่งผลให้เสริมฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้น และส่งผลให้มีฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Shori (2013) ที่ศึกษาปริมาณกรดอินทรีย์ในนมวัวหมักที่หมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก พบว่าเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างลดลง ปริมาณกรดทั้งหมดและกรดอินทรีย์สูงขึ้นจะช่วยเสริมฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ นอกจากนี้ในกระบวนการหมักสมุนไพรยังส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น สารกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ ที่ส่งเสริมกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของน้ำหมักสมุนไพรต่าง ๆ จากการศึกษาก่อนหน้านี้ของทศพล และคณะ (2559) ศึกษาการเพิ่มฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำพลูคาวด้วยการผสม

กับกระชายดำและหมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก พบว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay ของน้ำหมักพลูคาวที่ไม่มีการเติมกระชายดำแต่มีการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก และมีการเติมน้ำอ้อยลงไป มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay เท่ากับ 271.57 ไมโครโมลต่อลิตร (µmol/L) ซึ่งเพิ่มมากขึ้นกว่า 3.5 เท่าของน้ำหมักพลูคาวที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อและน้ำอ้อย และเมื่อน้ำหมักพลูคาวด้วยการผสมกับกระชายดำหมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกและเติมน้ำอ้อย พบว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay เท่ากับ 891.0 ไมโครโมลต่อลิตร ซึ่งพบว่าสูงกว่า 78.71 ไมโครโมลต่อลิตร ที่ได้จากการหมักที่ใช้น้ำหมักพลูคาวเพียงอย่างเดียว จะเห็นว่ากระชายดำมีผลโดยตรงต่อการเพิ่มฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP assay ของน้ำหมักพลูคาว แต่ไม่มีผลเพิ่มปริมาณของกรดแลคติกและกรดอะซิติก ยิ่งไปกว่านั้นพบว่าปริมาณของกรดอินทรีย์จากแบคทีเรียกรดแลคติกที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักมีผลเสริมให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้น มีการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Chaiyasut *et al.* (2011) ทำการศึกษาสมุนไพรไทย 5 ชนิด ได้แก่ พลูคาว มะขามป้อม ลูกยอ สมอไทย และกระชายดำ หมักรวมกันโดยใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก พบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้นเท่ากับ 31.31 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อมิลลิลิตร (mg GAE/ml) การศึกษาของ Sawangwan *et al.* (2021) ทำการศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระจากการหมักรำข้าวโดยแบคทีเรียกรดแลคติก พบว่าสารสกัดรำข้าวที่มีการหมักแบบสถานะของแข็ง (SSF) ของแบคทีเรียแลคติกทั้งสองสายพันธุ์มีปริมาณฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดรำข้าวที่ไม่มีการหมักแบบของแข็ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารสกัดข้าวบาห์นหน้าที่มีความชื้นร้อยละ 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

การศึกษาการส่งเสริมกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกระชายขาวที่หมักด้วยเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก 10 สายพันธุ์ พบว่าสายพันธุ์ของเชื้อเริ่มต้น (starter culture) และระยะเวลาในการหมักส่งผลต่อการเพิ่มฤทธิ์ทางชีวภาพและกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของน้ำหมักกระชายขาวได้ ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 10 สายพันธุ์ ให้ฤทธิ์ทางชีวภาพและกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และเมื่อระยะเวลาในการหมักเพิ่มขึ้นส่งผลต่อค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นด้วย งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยที่ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดกระชายขาวหมักที่ใช้เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์แตกต่างกันที่ผ่านการศึกษาคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติก เพื่อเพิ่มคุณค่าทางสารอาหาร เครื่องดื่ม ทางยา และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูง เพื่อเพิ่มมูลค่าให้กับผลิตภัณฑ์และน้ำหมักที่ผลิตได้จะนำไปต่อยอดเกี่ยวกับกลไกการต้านแบคทีเรียก่อโรค เพื่อเป็นประโยชน์ในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์บรรเทาอาการอักเสบ การผลิตกรดของแบคทีเรียในระหว่างการหมัก สารต้านอนุมูลอิสระ และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เพิ่มขึ้นจะช่วยในการยับยั้งการต้านแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการอักเสบได้ 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 ธีระ ฤทธิรอด และสิรินดา ยุ่นฉลาด. (2559). การเพิ่มฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำพลูคาวด้วยการผสมกับกระชายดำและหมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก. *วารสารวิจัย มข*. (ฉบับบัณฑิตศึกษา), 16(1), 64-76.

ลัญจกร จันทร์อุดม นุชวรา องศารา ดาวีณาร์ ยีเลาะ และสุไรดา มามะแตหะ. (2559). การเปลี่ยนแปลงทางเคมีและจุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์ปอเยาะทุเรียนระหว่างการหมัก, *วารสารวิชชา 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.

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.