ฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่น และฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย Methicillin – resistant Staphylococcus aureus (MRSA) ของสมุนไพรที่หมักร่วมกับแบคทีเรียกรดแลคติค

วิทยานิพนธ์

ของ

วันวิสาข์ บุญกล้า

เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มิถุนายน 2565

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

ฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่น และฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย Methicillin – resistant Staphylococcus aureus (MRSA) ของสมุนไพรที่หมักร่วมกับแบคทีเรียกรดแลคติค

วิทยานิพนธ์
ของ
วันวิสาข์ บุญกล้า

เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
มิถุนายน 2565
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

Antioxidant and bioactive compounds of Finger Root fermented by lactic acid bacteria against Methicillin – resistant Staphylococcus aureus (MRSA)

Wanwisa Boonkla

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of Requirements

for Master of Science (Biotechnology)

June 2022

Copyright of Mahasarakham University

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของนางสาววันวิสาข์ บุญกล้า แล้วเห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รศ. ดร. บวรศักดิ์ ลีนานนท์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผศ. ดร. ปริยาภรณ์ อิศรานุวัฒน์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผศ. ดร. อนุศักดิ์ เกิดสิน)

.....กรรมการ
(อ. ดร. อิสราภรณ์ สมบุญวัฒนกุล)

.....กรรมการ
(รศ. ดร. ลือชัย บุตคุป)

มหาวิทยาลัยอนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

.....
(ผศ. ดร. สุมลวรรณ ชุ่มเชื้อ)
คณบดีคณะเทคโนโลยี

.....
(รศ. ดร. กริสน์ ชัยมูล)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง ฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่น และฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย Methicillin – resistant Staphylococcus aureus (MRSA) ของสมุนไพรที่หมักร่วมกับแบคทีเรียกรดแลคติค

ผู้วิจัย วันวิสาข์ บุญกล้า

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปริยาภรณ์ อิศรานุวัฒน์
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนุศักดิ์ เกิดสิน

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต **สาขาวิชา** เทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหาสารคาม **ปีที่พิมพ์** 2565

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากกระชายขาวหมักด้วยแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก (lactic acid bacteria) ซึ่งปัจจัยที่ศึกษา 2 ปัจจัย ได้แก่ สายพันธุ์ของเชื้อเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก 10 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lactobacillus pentosus* JM085, *Lactobacillus pentosus* JM0812, *Lactobacillus pentosus* UM055, *Lactobacillus pentosus* UM054, *Lactobacillus pentosus* YM122, *Lactococcus lactis* A7, *Lactobacillus pentosus* VM096, *Lactobacillus pentosus* DM068, *Enterococcus faecalis* YM126 และ *Lactobacillus pentosus* VM095 และระยะเวลาในการหมัก ได้แก่ 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ผลการทดลอง พบว่า กระบวนการหมักกระชายขาวด้วยแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก ส่งผลให้จำนวนเชื้อ lactic acid bacteria เพิ่มขึ้น และค่าพีเอชลดลง (ที่เวลาในการหมัก 72 ชั่วโมง จำนวนเชื้อ มีค่าระหว่าง Log 4.0 -6.8 CFU/ml และค่า pH 2.8-3.7) ตามระยะเวลาในการหมัก กระชายขาวที่หมักกับเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกสายพันธุ์ที่แตกต่างกันและระยะเวลาในการหมักที่แตกต่างกันส่งผลต่อกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ทางชีวภาพแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และวิธี FRAP เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ พบว่า ระยะเวลาในการหมักเพิ่มขึ้นจะส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของการยับยั้งกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระอย่างมีนัยสำคัญ และกระชายขาวที่เสริมด้วยฤทธิ์ด้วย *L. pentosus* DM068 ที่ระยะเวลาในการหมัก 72 ชั่วโมง ส่งผลต่อการยับยั้งกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดเท่ากับ 83.42±1.30 μg TE/mL และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP พบว่า กระชายขาวที่เสริมด้วยฤทธิ์ด้วย *L. pentosus* VM095 ที่ระยะเวลาในการหมัก 72 ชั่วโมง ส่งผลต่อการยับยั้งกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดเท่ากับ 295.82±2.15 μg Fe(II)/ mL ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดผลการทดลอง พบว่า ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ระยะเวลาในการหมักเพิ่มขึ้นจะส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และพบว่ากระชายขาวที่เสริมด้วยฤทธิ์ด้วยเชื้อ *E. faecalis* YM126 ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง มีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงที่สุดเท่ากับ 226.43±14.29 μg RE/ mL และปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดพบว่ากระชายขาวที่เสริมด้วยฤทธิ์ด้วยเชื้อ *L. lactis* A7 และสายพันธุ *L. pentosus* DM068 มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุดเท่ากับ 298.85±1.89, 281.83±1.76 μg GAE/ mL ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง และการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรีย MRSA พบว่า น้ำหมักกระชายขาวที่หมักด้วยแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรีย MRSA ได้ ดังนั้นการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการเสริมด้วยฤทธิ์ด้วยเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก และระยะเวลาในการหมักสามารถเพิ่มกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ทางชีวภาพและของกระชายขาวได้

คำสำคัญ : กระชายขาว, แบคทีเรียกรดแลคติก, กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ, สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

TITLE Antioxidant and bioactive compounds of Finger Root fermented by lactic acid bacteria against Methicillin – resistant Staphylococcus aureus (MRSA)

AUTHOR Wanwisa Boonkla

ADVISORS Assistant Professor Pariyaporn Itsaranuwat , Ph.D.

Assistant Professor Anusak Kerdsin , Ph.D.

DEGREE Master of Science **MAJOR** Biotechnology

UNIVERSITY Mahasarakham University **YEAR** 2022

ABSTRACT

This work aimed to study antioxidant activities and antimicrobial activity against Meticillin-resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) of *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. (Krachai) fermented with 10 strains of lactic acid bacteria, namely *Lactobacillus pentosus* JM085, *Lactobacillus pentosus* JM0812, *Lactobacillus pentosus* UM055, *Lactobacillus pentosus* UM054, *Lactobacillus pentosus* YM122, *Lactobacillus pentosus* VM095, *Lactobacillus pentosus* VM096, Lactobacillus pentosus DM068, *Enterococcus faecalis* YM126 and *Lactococcus lactis* A7 during 0, 24, 48, and 72hours fermentation. The results showed that when fermentation time increased, the numbers of all strains of LAB increased; whereas, pH values decreased. The study of antioxidant activities and bioactive compound contents found that DPPH and FRAP increased significantly ($p < 0.05$) when the time of fermentation increased. The highest DPPH (83.42±1.30 μg TE/mL) was found in sample fermented with *L. pentosus* DM068 at 72 hours; while, the highest FRAP (295.82±2.15 μg Fe(II)/ mL), total flavonoid content (226.43±14.29 μg RE/ mL), total phenolic content (276.01±9.72 μg GAE/ mL) were reported in samples fermented with *L. pentosus* VM09, *E. faecalis* YM126, *Lc. lactis* A7 at 72 hours, respectively. For antimicrobial activity investigation, it found that Krachai fermented with LAB was not able to inhibit tested MRSA strains. To conclude, LAB fermentation of Krachai resulted in an increase of antioxidant activities and bioactive

compound contents but unable to inhibit MRSA. For further study, it might be interesting to screen other herbs and optimize fermentation conditions to obtain potential extract for MRSA inhibition.

Keyword : Boesenbergia rotunda (L.) Mansf, Lactic acid bacteria, Antioxidant activity, Bioactive compounds

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจาก สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประเภทบัณฑิตศึกษาประจำปี พ.ศ. 2562

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความกรุณาและความช่วยเหลืออย่างสูงยิ่งจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปริยาภรณ์ อิศรานุวัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนุศักดิ์ เกิดสิน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม รองศาสตราจารย์ ดร. บวรศักดิ์ ลีนานนท์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. ลือชัย บุตคุป กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และอาจารย์ ดร. อิสราภรณ์ สมบุญวัฒนกุล กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่อบรมสั่งสอนให้ความรู้ต่อศิษย์

ขอขอบคุณภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ อุปกรณ์ และเครื่องมือในการวิจัย

ขอขอบคุณภาควิชาอนามัยชุมชน คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตสกลนคร ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ อุปกรณ์ และเครื่องมือในการวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณบิดามารดาที่คอยให้กำลังใจและช่วยเหลือในทุกสิ่งด้วยดีตลอดมา ทั้งคำปรึกษากำลังใจ และให้โอกาสทางการศึกษา ตลอดระยะเวลาในการทำวิจัยนี้จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

คุณประโยชน์และคุณค่าจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบเป็นเครื่องบูชาพระคุณบุพการี บูรพาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่านที่มีส่วนร่วมในการอบรมสั่งสอน ทั้งวิชาการ คุณธรรม จริยธรรม แก่ผู้วิจัยในการทำวิทยานิพนธ์นี้ให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

วันวิสาข์ บุญกล้า

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ฉ
กิตติกรรมประกาศ ..... ซ
สารบัญ ..... ฌ
สารบัญตาราง ..... ฐ
สารบัญรูปภาพ ..... ฒ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 2
1.3 ขอบเขตการวิจัย 2
1.4 สมมุติฐานของงานวิจัย 2
1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย 3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4
2.1 แบคทีเรียกรดแลคติก (LAB) 4
2.1.1 เมแทบอลิซึมของการหมักแบคทีเรียกรดแลคติก (LAB) 4
2.1.2 สารยับยั้งที่ได้จากแบคทีเรียกรดแลคติก (Antimicrobial substance) 5
2.1.3 *Lactobacillus* sp. 10
2.1.4 *Lactobacillus pentosus* 10
2.1.5 ประโยชน์ของแบคทีเรียกรดแลคติก 11
2.2 สมุนไพรที่มีฤทธิ์ทางยา (Medicinal Plant) 12
2.2.1 กระชาย 13
2.2.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกระชาย 13

2.2.3 สายพันธุ์ของกระชาย 14
2.3 ยาปฏิชีวนะและการดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรีย 15
2.3.1 ยาปฏิชีวนะและกลไกการออกฤทธิ์ของยา 15
2.4.2 เชื้อแบคทีเรียดื้อยาปฏิชีวนะ 17
2.3.3 กลไกการดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรีย 18
2.4 *Staphylococcus aureus* 19
2.7 อนุมูลอิสระ (Free redicals) 22
2.8 สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) 23
2.9 สารประกอบฟีโนลิก (phenolic compounds) 24
2.10 ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) 25
2.11 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 26
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 29
3.1 อาหาร สารเคมี วัสดุอุปกรณ์ และเครื่องมือในการทำวิจัย 29
3.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย 31
3.2.1 เชื้อแบคทีเรีย 31
3.2.1.1 เชื้อแบคทีเรียก่อโรค 31
3.2.1.2 แบคทีเรียผลิตกรดแลคติก 31
3.3 แผนการดำเนินงานวิจัย 31
3.4 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง 32
3.4.1 การเตรียมสมุนไพร 32
3.4.2 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย 32
3.4.3 การศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและค่าพีเอช 32
3.4.4 การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ 32
3.4.4.1 วิธี DPPH 32

3.4.4.2 วิธี FRAP 33
3.4.5 การวิเคราะห์ปริมาณฟลาวนอยด์ทั้งหมด (Total flavonoids content 33
3.4.6 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolics content) 33
3.4.7 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย MRSA โดยการหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ด้วยวิธี Broth microdilution ของน้ำหมักกระชายขาวร่วมกับแบคทีเรียกรดแลกติก 34
3.4.8 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย MRSA โดยการหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ด้วยวิธี Broth microdilution ของน้ำหมักกระชายขาวร่วมกับแบคทีเรียกรดแลกติกที่ทำแห้ง ด้วยวิธี Freeze Drying 34
3.4.9 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย MRSA โดยการหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ด้วยวิธี Broth microdilution ของน้ำหมักกระชายขาวร่วมกับแบคทีเรียกรดแลกติก ที่ทำแห้ง ด้วยวิธีอบแห้งด้วยตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง 35
3.5 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล 36
บทที่ 4 ผลและอภิปรายผลการทดลอง 37
4.1 การศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกและค่าพีเอชต่อการหมักกระชายขาว 37
4.2 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ 38
4.3 ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total flavonoinds content) 39
4.4 ปริมาณฟีโนลิกทั้งหมด (Total phenolics content) 39
4.5 การยับยั้งแบคทีเรีย MRSA โดยการหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ด้วยวิธี Broth microdilution 45
4.5.1 ผลการยับยั้งแบคทีเรีย MRSA โดยการหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ด้วยวิธี Broth microdilution ของน้ำหมักกระชายขาวร่วมกับแบคทีเรียกรดแลกติกที่ทำแห้ง ด้วยวิธี Freeze 47
4.5.2 ผลการยับยั้งแบคทีเรีย MRSA โดยการหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ด้วยวิธี Broth microdilution ของน้ำหมักกระชายขาวร่วมกับแบคทีเรียกรด

แลกติก ที่ทำแห้ง ด้วยวิธีอบแห้งด้วยตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 40 องศา เป็นเวลา 48 ชั่วโมง 50

บทที่ 5 บทสรุปและข้อเสนอแนะ 53

5.1 สรุปผลการทดลอง 53

5.2 ข้อเสนอแนะ 54

บรรณานุกรม 55

ภาคผนวก 62

ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ 63

ภาคผนวก ข กราฟมาตราฐาน 65

ภาคผนวก ค ตารางค่า ANOVA, Descriptive และ Duncan Statistics 68

ประวัติผู้เขียน 138

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างแบคเทอริโอซินและสารปฏิชีวนะ 9

ตารางที่ 2 อาหาร สารเคมี วัสดุอุปกรณ์ และเครื่องมือในการทำวิจัย..... 29

ตารางที่ 3 ผลของน้ำหมักกระชายขาวที่หมักด้วยแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก 10 สายพันธุ์ ต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระวิธี DPPH และวิธี FRAP..... 41

ตารางที่ 4 ผลของน้ำหมักกระชายขาวที่หมักด้วยแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก 10 สายพันธุ์ ต่อสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด..... 43

ตารางที่ 5 ผลของน้ำหมักกระชายขาวที่หมักด้วยแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก 10 สายพันธุ์ ต่อสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด 44

ตารางที่ 6 Descriptive ของเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกและระยะเวลาในการหมัก..... 69

ตารางที่ 7 Multivariate Tests ของเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกและระยะเวลาในการหมัก..... 77

ตารางที่ 8 Tests of Between-Subjects Effects ของกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ..... 78

ตารางที่ 9 Estimates ของกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ สารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ (แบคทีเรียผลิตกรดแลคติก)..... 80

ตารางที่ 10 Pairwise Comparisons ของกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ สารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ (แบคทีเรียผลิตกรดแลคติก)..... 83

ตารางที่ 11 Multivariate Tests ของของกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ สารประกอบฟีนอลิก 124

ตารางที่ 12 Univariate Tests ของกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ สารประกอบฟีนอลิก..... 124

ตารางที่ 13 Estimates ของกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ สารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ (ระยะเวลาในการหมัก)..... 125

ตารางที่ 14 Pairwise Comparisons ของกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ สารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ (ระยะเวลาในการหมัก)..... 126

ตารางที่ 15 Multivariate Tests ของกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ สารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ (ระยะเวลาในการหมัก)..... 129

ตารางที่ 16 Univariate Tests ของกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ สารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ (ระยะเวลาในการหมัก)..... 130
ตารางที่ 17 Duncan ของกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH (แบคทีเรียผลิตกรดแลคติก)..... 131
ตารางที่ 18 Duncan ของกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี FRAP (แบคทีเรียผลิตกรดแลคติก)..... 132
ตารางที่ 19 Duncan ของสารประกอบฟีนอลิก (แบคทีเรียผลิตกรดแลคติก)..... 133
ตารางที่ 20 Duncan ของสารฟลาโวนอยด์ (แบคทีเรียผลิตกรดแลคติก)..... 134
ตารางที่ 21 Duncan ของกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH (ระยะเวลาในการหมัก)..... 135
ตารางที่ 22 Duncan ของกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี FRAP (ระยะเวลาในการหมัก)..... 135
ตารางที่ 23 Duncan ของสารประกอบฟีนอลิก (ระยะเวลาในการหมัก)..... 136
ตารางที่ 24 Duncan ของสารฟลาโวนอยด์ (ระยะเวลาในการหมัก)..... 137

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปภาพที่ 1 ลักษณะของกระชาย 13

รูปภาพที่ 2 ลักษณะของ *S. aureus* 19

รูปภาพที่ 3 การเจริญของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด 10 สายพันธุ์ 38

รูปภาพที่ 4 การยับยั้งเชื้อ mec 3 เชื้อ mec 4 และ เชื้อ S. aureus ATcc 25923 ของกระชายหมักร่วมกับเชื้อ L. lactis A7 45

รูปภาพที่ 5 การยับยั้งเชื้อ mec 3 เชื้อ mec 4 และเชื้อ *S. aureus* ATcc 25923 ของกระชายหมักร่วมกับเชื้อ *E. faecalis* YM126 46

รูปภาพที่ 6 การยับยั้งเชื้อ mec 3 เชื้อ mec 4 และ เชื้อ S. aureus ATcc 25923 ของกระชายหมักร่วมกับเชื้อ L. pentosus DM068 46

รูปภาพที่ 7 การยับยั้งเชื้อ mec 3 เชื้อ mec 4 และ เชื้อ *S. aureus* ATcc 25923 ของกระชายหมักร่วมกับเชื้อ *L. pentosus* VM095 47

รูปภาพที่ 8 การยับยั้งเชื้อ mec 3 เชื้อ mec 4 และ เชื้อ S. aureus ATcc 25923 ของกระชายหมักร่วมกับ เชื้อ L. lactis A7 โดยเพิ่มความเข้มข้นด้วยวิธี Freeze Dry 48

รูปภาพที่ 9 การยับยั้งเชื้อ mec 3 เชื้อ mec 4 และ เชื้อ S. aureus ATcc 25923 ของกระชายหมักร่วมกับเชื้อ E. faecalis YM126 โดยเพิ่มความเข้มข้นด้วยวิธี Freeze Dry 48

รูปภาพที่ 10 การยับยั้งเชื้อ mec 3 เชื้อ mec 4 และเชื้อ S. aureus ATcc 25923 ของกระชายหมักร่วมกับเชื้อ L. pentosus DM068 โดยเพิ่มความเข้มข้น ด้วยวิธี Freeze Dry 49

รูปภาพที่ 11 การยับยั้งเชื้อ mec 3 เชื้อ mec 4 และเชื้อ S. aureus ATcc 25923 ของกระชายหมักร่วมกับเชื้อ L. pentosus VM095 โดยเพิ่มความเข้มข้นด้วยวิธี Freeze Dry 49

รูปภาพที่ 12 การยับยั้งเชื้อ mec 3 เชื้อ mec 4 และเชื้อ S.aureus ATcc 25923 ของกระชายหมักร่วมกับเชื้อ L. pentosus VM095 และ L. lactis A7 โดยเพิ่มความเข้มข้นด้วยวิธีอบแห้งที่อุณหภูมิ 40 องศา เวลา 48 ชั่วโมง 50

รูปภาพที่ 13 การยับยั้งเชื้อ mec 3 เชื้อ mec 4 และเชื้อ S. aureus ATcc 25923 ของกระชายหมักร่วมกับเชื้อ L. pentosus VM095 และ L. lactis A7 โดยเพิ่มความเข้มข้นด้วยวิธีอบแห้งที่อุณหภูมิ 40 องศา เวลา 48 ชั่วโมง..... 51

รูปภาพที่ 14 กราฟของสารมาตรฐานโทรล็อกซ์ (Trolox)..... 66

รูปภาพที่ 15 กราฟของสารมาตรฐานเฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4•7H_2O$)..... 66

รูปภาพที่ 16 กราฟของสารมาตรฐานกรดแกลลิก 67

รูปภาพที่ 17 กราฟของสารมาตรฐานรูติน..... 67

บทที่ 1
บทนำ

สมุนไพรที่มีฤทธิ์ทางยา (Medicinal Plant) หรือไฟโตเทอราปี (Phytotherapy) การใช้พืชสมุนไพรในการรักษาโรคมีประวัติมาอย่างยาวนานในพื้นที่ต่างๆ ทั่วโลก การที่สมุนไพรมีสรรพคุณทางยาหรือใช้ในการรักษาโรค เนื่องจากสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) หรือสารพฤกษเคมี (phytochemical) ในสมุนไพรเหล่านั้นมีฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างใดอย่างหนึ่งหรือต่ออาการของโรค สมุนไพรหลายชนิดมีคุณสมบัติการต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial activities) เนื่องจากมีองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น สารประกอบกลุ่มฟีนอลิค หรือฟลาโวนอยด์ (Pesewu et al., 2008)

กระชายเป็นพืชในวงศ์ Zingiberaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. (Chong et al., 2011; Jing et al., 2010; Yusuf et al., 2013) เป็นพืชสมุนไพรไทยและเป็นเครื่องเทศที่สำคัญที่นำมาประกอบอาหาร และส่วนที่นำใช้ประโยชน์คือเหง้าหรือราก (rhizomes) เหง้าของกระชายถูกนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์แผนโบราณ โดยนำมารักษาโรคอักเสบ (เช่น ฟันผุ โรคผิวหนัง ไอแห้ง และหวัด) (Chuakul & Boonpleng, 2003; Salguero, 2003) แผลในกระเพาะอาหารและฆ่าพยาธิ (Riswan & Roemantyo, 2002) ในเหง้าของกระชายมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เป็นสารทุติยภูมิของพืชหลายชนิด เช่น อนุพันธ์ฟลาโวนอยด์ น้ำมันหอมระเหย และสารประกอบโพลีฟีนอล (Tang et al, 2007; Morikawa et al, 2008; Yusuf et al, 2013; Baharudin et al, 2015; Jing et al, 2010) ในปัจจุบันมีการใช้กระชายเป็นสมุนไพรที่มีฤทธิ์ทางยาหรือส่งเสริมสุขภาพอย่างแพร่หลาย และมีงานวิจัยหลายฉบับพบว่า กระชายมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

แลคติกแอซิดแบคทีเรีย (lactic acid bacteria, LAB) หรือที่เรียกว่าโปรไบโอติกที่อาศัยอยู่ในระบบย่อยอาหาร ยกตัวอย่างเช่น *Lactobacillus lactis, Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus faecalis* และ *Bifidobacterium* แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกที่มีบทบาทสำคัญในการสร้างประโยชน์ต่อสุขภาพของมนุษย์และสัตว์ มีรายงานหลายฉบับ พบว่า แบคทีเรียกลุ่มแลคติกสามารถยับยั้งเชื้อโรคในทางเดินอาหาร การผลิตสารต้านจุลชีพ การเพิ่มการตอบสนองของภูมิคุ้มกัน การปรับปรุงการเผาผลาญแลคโตส และการป้องกันมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ดี (Kechagia et al., 2013) แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกนี้สามารถผลิตสารประกอบที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย หรือจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ได้หลายชนิด เช่น กรดอินทรีย์ (organic acid) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogenperoxide) ไดอะซิติล (diacetyl) อะซิตัลดีไฮด์ (acetaldehyde) รูเทอริน (reuterin)

แบคเทอริโอซิน (bacteriocins) นอกจากนี้กระบวนการหมักยังอาจส่งเสริมการเพิ่มสารสำคัญในผลิตภัณฑ์ได้อีกด้วย ดังนั้นงานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากการหมักกระชายขาวที่หมักด้วยแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก (lactic acid bacteria) โดยใช้แบคทีเรียกลุ่มผลิตกรดแลคติก 10 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lactobacillus pentosus* JM085, *Lactobacillus pentosus* JM0812, *Lactobacillus pentosus* UM055, *Lactobacillus pentosus* UM054, *Lactobacillus pentosus* YM122, *Lactococcus lactis* A7, *Lactobacillus pentosus* VM096, *Lactobacillus pentosus* DM068, *Enterococcus faecalis* YM126 และ *Lactobacillus pentosus* VM095

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาฤทธิ์ของกระชายขาวที่หมักด้วยแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก (lactic acid bacteria) และระยะเวลาในการหมัก ได้แก่ 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ MRSA

1.2.2 เพื่อศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระ และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากกระชายขาวที่หมักด้วยแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก (lactic acid bacteria)

1.3 ขอบเขตการวิจัย

1.3.1 ศึกษาคุณสมบัติของน้ำหมักกระชายขาวที่หมักด้วยแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ MRSA

1.3.2 ศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพกระชายขาวที่หมักด้วยแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก (lactic acid bacteria) 10 สายพันธุ์ และยะเวลาในการหมัก

1.4 สมมุติฐานของงานวิจัย

1.4.1 น้ำหมักกระชายขาวที่หมักด้วยแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ MRSA

1.4.2 สายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แตกต่างกันและระยะเวลาที่แตกต่างกันส่งผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ MRSA แตกต่างกัน

1.4.3 น้ำหมักกระชายขาวที่หมักด้วยแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกแตกต่างกันและระยะเวลาที่แตกต่างกันมีผลต่อสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกัน

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1.5.1 ทราบฤทธิ์ของกระชายขาวที่หมักด้วยแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ MRSA

1.5.2 ทราบสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ MRSA

1.5.3 ทราบฤทธิ์ของกระชายขาวที่หมักด้วยแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก (lactic acid bacteria) มีสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แบคทีเรียกรดแลคติก (LAB)

แบคทีเรียกรดแลคติกถือเป็นกลุ่มแบคทีเรียโปรไบโอติกที่สำคัญ (Metchnikoff, 1908; Schrezenmeir and de Verse, 2001) และถือเป็นส่วนสำคัญของสุขภาพจุลชีววิทยาทางเดินอาหาร (GI) และเกี่ยวข้องกับการเผาผลาญอาหารของโฮสต์ การหมักได้รับการระบุว่าเป็นกลไกของโปรไบโอติก (Gibson and Fuller, 2000; Metchnikoff,1908) แบคทีเรียกรดแลคติกร่วมกับจุลินทรีย์ในลำไส้อื่นๆ หมักกับซับสเตรตต่างๆ เช่น แลคโตส เอมีนชีวภาพและสารประกอบก่อภูมิแพ้ใน SCFA และกรดอินทรีย์อื่น ๆ และก๊าซ (Gibson and Fuller, 2000; Jay, 2000) นอกจากนี้ยังสามารถสังเคราะห์เอ็นไซม์วิตามิน สารต้านอนุมูลอิสระ และแบคทีเรีย ด้วยคุณสมบัติเหล่านี้ แบคทีเรียกรดแลคติกในลำไส้ถือเป็นกลไกสำคัญในการเผาผลาญและล้างพิษของต่างๆของสารที่เข้าสู่ร่างกาย (Salminen, 1990)

2.1.1 เมแทบอลิซึมของการหมักแบคทีเรียกรดแลคติก (LAB)

เนื่องจากอาหารเป็นแหล่งที่จุลินทรีย์สามารถใช้ได้อย่างดีในการเจริญ กระบวนการหมักดองของอาหารทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีอาหาร เนื่องจากการกระทำของเอนไซม์ ซึ่งอาจจะเป็นเอนไซม์มาจากจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมักดองหรือเอนไซม์ที่มีอยู่ในอาหารนั้นๆ โดยทั่วไปกระบวนการหมักดองจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการหมักเป็นจุลินทรีย์จากธรรมชาติ แต่ในบางครั้งในโรงงานอุตสาหกรรมจะมีการคัดเลือกชนิดของจุลินทรีย์เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มี รส กลิ่น และเนื้อสัมผัสที่ได้ตามต้องการสำหรับกระบวนการหมักที่เกิดกรดแลคติกมีระดับความเป็นกรดสูง เนื่องจากค่าพีเอชต่ำ ประสิทธิภาพการเกิด Oxidation-Reduction ก็จะทำให้ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นๆ ที่ไม่ต้องการในกระบวนการหมักกรดแลคติก กระบวนการหมักดองแลคติกที่สำคัญ มี 2 กระบวนการได้แก่

1) Homofermentative เป็นกระบวนการที่เกิดกรดแลคติกเป็นส่วนใหญ่จากจุลินทรีย์พวก Homofermentative lactic acid bacteria ขั้นตอนการผลิตกรดแลคติกเริ่มจากน้ำตาลแลคโตสจะผ่านเข้าเซลล์ของแลคติกแบคทีเรีย (lactic acid bacteria) โดยอาศัยเอนไซม์ที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มไซโตพลาสซึมที่เรียกว่า Phosphoenol-Pyruvate Dependent Phosphotransferase System (PEP-PST) ทำให้แลคโตสเกิดปฏิกิริยาเติมหมู่ฟอสเฟต (Phosphorelation) อยู่ในรูปแลคโตส Lactose-6-Phosphate กับ Glucose-6-Phosphate จากนั้นจะถูกเอนไซม์ Phospho-ß-Galactosidase ไฮโดรไลซ์ได้เป็น Galactose -6-Phosphate

กับ Glucose ซึ่ง Glucose จะถูกส่งเข้าสู่กระบวนการต่างๆ โดย D-Tagatose-6-Phosphate Pathway ได้เป็น Tagatose-1,6-Dophosphate และเปลี่ยนเป็น Dihydroxyacetone-Phosphate ท้ายสุดเอนไซม์Tagatose-1,6-Aldolase ซึ่งจะเปลี่ยนเป็น Glyceraldehyde-3-Phosphate โดนเอนไซม์ Tritose Phosphate Isomerase ซึ่ง Gleceraldehyde-3-Phosphate เป็นสารตัวกลางในกระบวนการ EMP pathway แลกเปลี่ยนเป็นแลคโตส (Lactose) ในที่สุด

2) Heterofermentative เป็นกระบวนการที่เกิดกรดแลคติคประมาณ 50% จะได้ผลิตภัณฑ์อื่นร่วมด้วย เช่น กรดอะซิติก เอธิลอัลกอฮอล์ และคาร์บอนไดออกไซด์ โดยจุลินทรีย์พวก Heterofermentative lactic acid bacteria ในกลุ่มนี้จะมีเอนไซม์ Aldose ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกระบวนการ Glycolysis จึงทำให้ไม่สามารถย่อยสลาย fructose-1,6-Diphosphate เป็น Triose-Phosphate จึงต้องออกซิไดซ์ Glucose-6-Phosphate ได้เป็น 6-Phosphogluconate จากนั้นจะเกิดปฏิกิริยา Decaboxylate ได้เป็น Pentose-Phosphate กับคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่ง Pentose Phosphate จะแตกตัวเป็น Triose-Phosphate และ Acetyl-Phosphate โดยเอนไซม์ Phophoketolase โดยที่ Triose-Phosphate จะเปลี่ยนเป็น Lactase ได้เป็น Acetyl-Phosphate จะเปลี่ยน Acetyldehyde

2.1.2 สารยับยั้งที่ได้จากแบคทีเรียกรดแลคติก (Antimicrobial substance)

แบคทีเรียแลคติคสามารถผลิตสารประกอบที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียหรือ จุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ได้สารแบคทีเรียทีสร้างขึ้นมีดังนี้

1. กรดอินทรีย์ (organic acid)

กรดอินทรีย์ที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก คือ กรดแลคติก และกรดอะซิติก ในอาหารที่มีกรดแลคติกโดยแบคทีเรียจะมีการสะสมของกรดอินทรีย์ ทำให้ค่าพีเอชของอาหารลดลง ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญทำให้กรดแลคติกที่แบคทีเรียถูกนำมาใช้ในการถนอมอาหาร เนื่องจากสภาวะที่เป็นกรดจะสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งแกรมลบและแกรมบวกได้ ความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ของกรดอินทรีย์จะขึ้นอยู่กับค่าพีเอช, pKa และความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ โดยทั่วไปกรดอะซิติกจะมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ดีกว่ากรดแลคติก กลไกการทำงานของกรดอินทรีย์เกิดจากกรดอินทรีย์ที่อยู่ในรูปไม่แตกตัวจะสามารถซึมผ่านผนังเซลล์ของแบคทีเรียและเกิดการสะสม ทำให้พีเอชภายในเซลล์สูงกว่าภายนอกเซลล์ กรดอินทรีย์ที่สะสมภายในเซลล์จะแตกตัวให้ไฮโดรเจนอิออน (hydrogen ion) เป็นจำนวนมาก ไฮโดรเจนอิออนจะไปรบกวนกระบวนการเมทาบอลิซึมของเซลล์แบคทีเรีย เช่น กระบวนการ translocation และ oxidative phosphorylation เป็นต้น (Baird-Parker, 1980) แต่ยังมีจุลินทรีย์บางชนิดที่สามารถทนต่อกรดอินทรีย์ได้ เช่น ยีสต์ รา และแบคทีเรียบางชนิดที่สร้างกรด (acid producing bacteria) แบคทีเรียที่ถูกยับยั้งการเจริญโดยกรดแลคติคจากเชื้อแลคติคแอสิด

แบคทีเรีย ได้แก่ *Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Escherichia coli* และ *Pseudomonas fluorescens* ซึ่งกรดแลคติคดังกล่าวสร้างโดยเชื้อ *Lactobacillus* spp. ที่แยกได้จากโยเกิร์ต เป็นต้น ส่วนแบคทีเรียที่ถูกยับยั้งการเจริญจากกรดอะซิติก ได้แก่ *Salmonella* spp. นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรียบางชนิดที่ถูกยับยั้งการเจริญโดยทั้งกรดแลคติคและกรดอะซิติกซึ่งสร้างจากแลคติคแอสิดแบคทีเรีย ได้แก่ *S. aureus*

2. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogenperoxide)

แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในสภาวะที่มีออกซิเจน กระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของแลคติคแอสิดแบคทีเรียมีดังนี้

pyruvate + O_2 + PO_4^{3-}	pyruvate oxidase	acetyl phosphate + CO_2 + H_2O_2
lactate + O_2	L-lactate oxidase	pyruvate + H_2O_2
lactate + O_2	NAD-independent	pyruvate + H_2O_2
NADH + H^+ + O_2	NADH oxidase	NAD + H_2O_2

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นได้ เนื่องจากไปทำให้เกิด peroxidation ของไขมันที่อยู่ในชั้นเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียแล้วทำให้ permeability ของเยื่อหุ้มเซลล์สูงขึ้นความสามารถในการซึมผ่านเข้าและออกจากเยื่อหุ้มเซลล์ของสารต่างๆ จึงเสียไป และยังมีผลทำให้เกิดการทำลายชีวโมเลกุลอื่นๆ ภายในเซลล์ด้วย เช่น โปรตีนและกรดนิวคลีอิก ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์นอกจากจะมีผลต่อเซลล์โดยตรงแล้วยังมีผลในทางอ้อมด้วย เช่นเมื่อรวมกับ thiocyanate ภายในเซลล์และมีเอนไซม์ lactoperoxidase เป็นคะตะลิส จะทำให้เกิดสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ เรียกกระบวนการดังกล่าวว่า lactoperoxidase antibacterial system เนื่องจากแลคติคแอสิดแบคทีเรียไม่สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้ ดังนั้นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่ถูกสร้างและปล่อยออกมานอกเซลล์จึงสะสมอยู่ในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเป็นจำนวนมาก เมื่อมีการสะสมมากขึ้นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ก็อาจจะยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกได้ด้วย แต่บางครั้งแบคทีเรียที่ผลิดกรดแลคติกก็มีการปรับตัวทำให้สามารถทนต่อฤทธิ์ของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ โดยการกระตุ้นให้เซลล์สร้างโปรตีนชนิดหนึ่งที่เรียกว่า stress protein มายับยั้งการทำงานของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

จุลินทรีย์ที่ถูกยับยั้งการเจริญด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่มีอยู่หลายชนิด เช่น *S. aureus* ถูกยับยั้งการเจริญได้โดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ผลิตโดย *L. delbrueckii* subsp. *bugaricus* และ *L. delbrueckii* subsp. *lactis* (Dahiya and Speck, 1968) *Pseudomonas* spp. ถูกยับยั้งการเจริญได้โดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ผลิตโดย *L. plantarum* (Price and Lee, 1970)

และ *Psuedomonas fragi* ถูกยับยั้งการเจริญได้โดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ผลิตโดย *L. acidophilus* ซึ่งเป็นเชื้อที่พบอยู่ใน skim milk และ low fat milk เป็นต้น

3. ไดอะซิติล (diacetyl)

ไดอะซิติล หรือ 2,3-butanedione เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จากกระบวนการเมทาบอลิซึมของ pyruvate ทั้งแบบใช้ออกซิเจนและไม่ใช้ออกซิเจน แลคติคแอสิดแบคทีเรียที่สามารถสร้างไดอะซิติลได้จะต้องสามารถหมักซิเตรท (citrate) ได้ ไดอะซิติลเป็นสารที่สามารถยับยั้งการเจริญได้ทั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารและเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย ไดอะซิติลสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์ และรา ได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวก กลไกการทำงานของไดอะซิติลเกิดจากการไปรบกวนการใช้อาร์จินิน (arginine) ภายในเซลล์ โดยอะซิติลจะไปทำปฏิกิริยากับ arginine-binding protein ของแบคทีเรียแกรมลบ

ไดอะซิติลเป็นสารให้กลิ่นหอมซึ่งเป็นกลิ่นที่มีอยู่ในอาหารหมักหลายชนิด เช่น เนย ชีส ไวน์แดง ไวน์ขาว บรั่นดี และกาแฟ เป็นต้น ความเข้มข้นของไดอะซิติลที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารทั่วไปจะมากกว่า 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นของไดอะซิติลในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันออกไปเช่นปริมาณ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์และแบคทีเรียแกรมลบได้ ปริมาณ 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์และแบคทีเรียแกรมบวกอื่นๆ ที่ไม่ใช่แลคติคแอสิดแบคทีเรียได้ เป็นต้น ถึงแม้ว่าไดอะซิติลจะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ แต่การนำไปใช้ต้องใช้ในปริมาณค่อนข้างสูง อีกทั้งยังเป็นสารที่ให้กลิ่นหอม ดังนั้นจึงไม่นิยมนำไปใช้เป็นสารถนอมอาหาร (food preservative) เพื่อหวังผลในการฆ่าหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ แต่มักจะนิยมใช้เป็น aseptic agent ในการทำความสะอาดภาชนะหรือเครื่องมือต่างๆ ในอุตสาหกรรมอาหารมากกว่า เนื่องจากไดอะซิติลเป็นสารที่ระเหยได้เร็ว

4. อะซิตัลดีไฮด์ (acetaldehyde)

อะซิตัลดีไฮด์เป็นสารที่เกิดขึ้นในกระบวนการเมทาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตโดย heterofermentative lactic acid bacteria ซึ่งในที่สุดจะถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลโดยเอนไซม์ alcohol dehydrogenase ถ้าแลคติคแอสิดแบคทีเรียขาดเอนไซม์ alcohol dehydrogenase จะทำให้มีอะซิตัลดีไฮด์หลั่งออกมานอกเซลล์อะซิตัลดีไฮด์ยังเป็นสารที่ให้กลิ่นเฉพาะในโยเกิร์ตอีกด้วย อะซิตัลดีไฮด์ที่สร้างจากแลคติคแอสิดแบคทีเรียบางชนิดที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 1 ถึง 100 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคบางชนิดในอาหารได้ เช่น *E. coli, S. aureus* และ *Samonella typhimurium* เป็นต้น เนื่องจากปริมาณอะซิตัลดีไฮด์ที่พบในอาหารมีน้อยมาก เช่น ในโยเกิร์ตจะพบอะซิตัลดีไฮด์ประมาณ 25 ppm เท่านั้น ดังนั้นบทบาทในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารของอะซิตัลดีไฮด์จึงนับว่าน้อยมาก

5. รูเทอริน (reuterin)

รูเทอรินที่มีการศึกษากันมากได้มาจากรูเทอรินที่สร้างจากแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก เช่น *Lactobacillus reuterin* รูเทอรินมีคุณสมบัติที่สำคัญ คือ มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ละลายน้ำ ไม่ใช่โปรตีนเนื่องจากไม่ถูกทำลายจาก proteolytic enzyme จึงทำให้รูเทอรินแตกต่างจากแบคเทอริโอซิน (Axelsson et al., 1989) เมื่อศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของรูเทอริน พบว่าเป็น 3-hydroxypropionaldehyde ซึ่งอาจอยู่ในรูป monomer หรือ dimer โดยเกิดขึ้นในกระบวนการออกซิไดซ์ของ glycerol ในสภาพที่มีอากาศ โดยทั่วไปแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกจะไม่มี oxidative pathway สำหรับ glycerol ทำให้ไม่สามารถถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ ดังนั้นวิธีการที่แบคทีเรียผลิตกรดแลคติกจะใช้ glycerol เป็นแหล่งคาร์บอนได้คือ การทำให้ glycerol ให้เข้าสู่ intermediate state ของ 3-hydroxypropionaldehyde

ความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นของรูเทอรินค่อนข้างกว้าง สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งแกรมบวก และแกรมลบ ยีสต์ รา และโปรโตซัว แบคทีเรียที่ถูกยับยั้งการเจริญจากรูเทอริน ได้แก่ *Samonella, Shigella, Clostridium, Staphylococcus* และ *Listeria* เป็นต้น (Axelsson et al., 1989) กลไกการทำงานของรูเทอรินเชื่อว่าเกิดจากการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บางชนิด เช่น ribonucleotide reductase จึงทำให้เกิดการสังเคราะห์ DNA เสียไป ดังนั้นรูเทอรินหรือแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกที่สามารถสร้างรูเทอรินได้จึงน่าจะนำไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการผลิตอาหารเพื่อถนอมอาหารหรือในอุตสาหกรรมอาหารอื่นๆ ที่ต้องการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค

6. แบคเทอริโอซิน (Bacteriocins)

แบคเทอริโอซิน (พงษ์เทพ, 2546) เป็นโปรตีนที่สร้างจากแบคทีเรียมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นได้ ปกติแบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซินจะมีภูมิคุ้มกันต่อแบคเทอริโอซินที่ตนสร้างออกมา ดังนั้นจึงทำให้ไม่ถูกยับยั้งจากแบคเทอริโอซินของตนเอง การสร้างแบคเทอริโอซินของเชื้อแบคทีเรียเชื่อว่าเกิดจากการปรับตัวเพื่อความอยู่รอดในสภาพแวดล้อมที่มีเชื้อหลายชนิดเจริญอยู่ร่วมกันทำให้เชื้อที่สร้างแบคเทอริโอซินสามารถแย่งอาหารและพื้นที่เพื่อใช้ในการเจริญเติบโต ส่วนเชื้อชนิดอื่นที่ไม่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้ก็จะตายลงในที่สุด

ในการศึกษาวิจัยทางด้านสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ โดยทั่วไปอาจจะมีความสับสนหรือไม่แน่ใจระหว่างแบคเทอริโอซินและสารปฏิชีวนะ ได้สรุปความต่างระหว่างแบคเทอริโอซินและสารปฏิชีวนะไว้ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างแบคเทอริโอซินและสารปฏิชีวนะ

ลักษณะและคุณสมบัติ	แบคเทอริโอซิน	สารปฏิชีวนะ
การนำไปใช้งาน	ทางอาหาร	ทางการแพทย์
กระบวนการสังเคราะห์	ผลิตจากไรโบโซม	ผลิตโดยผ่านกระบวนการที่เป็น secondary metabolite
ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียเป้าหมายที่มีความหลากหลาย	น้อย	มาก
การสร้างระบบภูมิคุ้มกันตนเองของเซลล์ผู้ผลิต	มี	ไม่มี
กลไกในการต่อต้านของเซลล์เป้าหมาย	โดยปรับสภาพองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์	โดยการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม
ลักษณะของปฏิกิริยาบนเซลล์เป้าหมาย	ทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์	ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์หรือโครงสร้างภายในเซลล์
ความเป็นพิษหรือผลข้างเคียง	ยังไม่มีรายงาน	มี

ที่มา : พงษ์เทพ, (2546)

จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่าแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแกรมลบจะมีโมเลกุลขนาดใหญ่และมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียได้น้อยกว่าที่สร้างจากแบคทีเรียแกรมบวก (Jack et al., 1995) โดยแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแกรมลบได้มีการศึกษากันในด้านต่างๆ ได้แก่ โครงสร้างของโปรตีนกิจกรรมในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเป้าหมายกระบวนการสังเคราะห์ภายในเซลล์ที่ผลิต กลไกการเข้าทำลายและตำแหน่งของการเข้าทำลายเซลล์เป้าหมาย รวมถึงระบบภูมิคุ้มกันของเซลล์เป้าหมาย ตัวอย่างเช่น colicins ซึ่งผลิตโดย *E. coli* และมีผลในการยับยั้งแบคทีเรียกลุ่ม *Enterobacteriaceae* ชนิดอื่นๆ หรือ microcins ซึ่งผลิตโดยแบคทีเรียในกลุ่ม *Enterobacteriaceae* และมีผลในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบชนิดต่างๆ ส่วนแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียแกรมบวก พบว่ามีคุณสมบัติที่น่าสนใจกว่าที่ผลิตจากแบคทีเรียแกรมลบคือ มีคุณสมบัติในการทำลายแบคทีเรียที่แตกต่างกันได้หลายชนิดรวมทั้งเซลล์เป้าหมายจะมีการต้านทานน้อย และไม่ต้องการตำแหน่งเฉพาะเจาะจงบนเซลล์เป้าหมายเพื่อการเข้าทำลายนอกจากนี้การควบคุมการผลิตภายในเซลล์ถูกควบคุมได้ทั้งจากพลาสมิดและโครโมโซมโดยในกลุ่มของแบคทีเรียแก

รมบวก พบว่า แบคทีเรียผลิตกรดแลคติกมีบทบาทสำคัญ ในการสร้างสารซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มต่างๆ ได้หลายชนิด โดยแบคเทอริโอซินซึ่งพบว่าสารดังกล่าวเป็นสารเปปไทด์หรือโปรตีนขนาดเล็ก และในบางครั้งอาจพบกรดอะมิโนที่ไม่ค่อยพบในโปรตีนปกติทั่วไป เช่น dehydroalanine, dehydrobutyrine ที่พบในไนซิน โดยแบคเทอริโอซินแต่ละชนิดจะมีจำนวนและชนิดของกรดอะมิโนภายในโมเลกุลที่แตกต่างกัน และสามารถถูกทำลายได้ด้วยเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน (proteolytic enzymes)

2.1.3 *Lactobacillus* sp.

แลคโตบาซิลลัสเป็นแบคทีเรียในกลุ่มแกรมบวก ซึ่งแบคทีเรียนี้เป็นส่วนสำคัญของกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความสามารถในการแปลงแลคโตสและโมโนแซ็กคาไรด์อื่นๆ เป็นกรดแลคติก แบคทีเรียกรดแลคติกในลำไส้ของมนุษย์มีความเกี่ยวข้องกับแบคทีเรียที่ทำให้สุขภาพดีเพราะทำหน้าที่เป็น biodefense ที่สำคัญในการป้องกันการบุกรุกและต่อมาการแพร่กระจายของแบคทีเรียก่อโรคในลำไส้ แลคโตบาซิลลัสบางชนิดและบิฟิโดแบคทีเรียมที่ถูกอ้างว่าเป็นโปรไบโอติก ยกตัวอย่าง เช่น *Lb. acidophilus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. casei*, *Lb. fermentum*, *Lb. plantarum*, *Lb. reuteri*, *B. infantis*, *B. breve*, *B. animalis*, *B. adolescentis* และ *B. longum* ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้อยู่ในทางเดินอาหารของมนุษย์เป็นแบคทีเรียที่สามารถให้สุขภาพดีขึ้นและเป็นปรับสมดุลของลำไส้ต่อสภาพแวดล้อมที่รุนแรงและเชื้อก่อโรคที่ก่อให้เกิดภัยคุกคามที่สำคัญต่อสายพันธุ์โปรไบโอติก นอกจากนี้แรงตึงผิวต่ำและภูมิคุ้มกันการตอบสนองยังส่งผลต่อการอยู่รอดของสายพันธุ์โปรไบโอติก (Gilliland, 1979)

แลคโตบาซิลลัสมีผลดีต่อสุขภาพหลายอย่างที่ได้รับการพิสูจน์ทางวิทยาศาสตร์หรือได้รับการพิสูจน์ทางการแพทย์ เช่น การลดและการป้องกันโรคท้องร่วง การปรับปรุงสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้โดยฤทธิ์ต้านจุลชีพ การบรรเทาอาการแพ้แลคโตส การป้องกันการแพ้อาหาร การเพิ่มประสิทธิภาพของภูมิคุ้มกัน และกิจกรรมต้านเนื้องอก (Liong, 2006) เนื่องจากนมที่หมักด้วยแลคโตบาซิลลัสแสดงให้เห็นว่าแสดงผลกระทบต่อภาวะโคเลสเตอรอลในเลือดต่ำในมนุษย์ การศึกษาต่างๆ แสดงให้เห็นว่าแลคโตบาซิลลัสบางชนิดมีความสามารถในการลดคอเลสเตอรอลในมนุษย์ (Liong and Shah, 2005a)

2.1.4 *Lactobacillus pentosus*

Lactobacillus pentosus (*Lb. pentosus*) ได้รับการระบุว่ามีบทบาทดั้งเดิมในการเตรียมอาหารทั่วไปหลายชนิด รวมทั้งนมดิบและเปรี้ยว (Kim et al., 2006) ธัญพืชและผักหมัก (Tamminen et al.,2004) เนื้อสัตว์และปลาหมัก (Tanasupawat et al., 1998) และเครื่องดื่มหมัก เช่น สาเก ชา และสก๊อตมอลต์วิสกี้ (Tanasupawat and Komagata. 1994) *Lb. pentosus* ถูกใช้เป็นโคโลนีที่มีชีวิตในอาหารดิบๆ (เช่น นมเปรี้ยวและชีส) และใช้เป็นเซลล์ที่ตายแล้วในอาหารหมัก

ดองที่มีระยะสุกภายหลัง (เช่น ขนมปังซาวโดว์) การใช้โดยเจตนาและการมีอยู่ตามธรรมชาติของ *Lb. pentosus* ในอาหารที่มีความเป็นสากลซึ่งครอบคลุมประเทศต่างๆ ทั่วยุโรป แอฟริกาและเอเชีย คล้ายกับ *Lactobacillus* อื่นๆ สายพันธุ์ *Lb. pentosus* b240 เดิมแยกได้จากเมี่ยง ซึ่งเป็นชาหมักบ่มแบบดั้งเดิมทางภาคเหนือของประเทศไทย (Tanasupawat et al., 2007) เบื้องต้นระบุว่าเป็นสายพันธุ์ *Lb. plantarum* (สายพันธุ์ที่คล้ายคลึงกันทางฟีโนไทป์) แบคทีเรียถูกจัดประเภทใหม่ในภายหลังเป็น *Lb. pentosus* โดยการวิเคราะห์ทางพันธุกรรมโดยใช้ recA (Szabo et al., 2011)

Lb. pentosus เป็น heterofermentative ทางปัญญาเช่นเดียวกับแลคโตบาซิลลัส กลุ่มที่สองที่เรียกว่า แบคทีเรียแกรมบวก รูปทรงแท่งปลายมน 1-1.2 × 12-5.0 ไมครอน

2.1.5 ประโยชน์ของแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติกที่ส่งผลต่อการหมักของอาหารหมักสามารถแบ่งออกได้ดังต่อไปนี้

1. เพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ จากการศึกษาถึงข้อมูลในกลุ่มของธัญพืช พบว่า คุณค่าทางอาหารของผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มขึ้นมาจากกิจกรรมการหมักที่เกิดขึ้นในกระบวนการผลิตโดยเฉพาะการเพิ่มองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่จำเป็น นอกจากนั้นคุณค่าทางด้านโปรตีนในอาหารที่มีส่วนของธัญพืช และถั่วยังเพิ่มขึ้นอีกด้วย องค์ประกอบของวิตามินบางชนิดยังพบได้ในระหว่างการหมัก เพราะมีจุลินทรีย์บางชนิดสังเคราะห์วิตามินที่จำเป็นต่อการเจริญ จึงทำให้องค์ประกอบของวิตามินในอาหารที่ผ่านการหมักสูงกว่าอาหารที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก เช่น ในเทมเป้จากแป้งสาลี พบว่าปริมาณของไนอะซิน ไรโบฟลาวิน และไทอะมินก่อนการหมัก เท่ากับ 46.0, 0.4 และ 3.2 ไมโครกรัมต่อกรัม เพิ่มเป็น 135.0, 3.2 และ 3.2 ไมโครกรัมต่อกรัม ภายหลังการหมัก โดยส่วนใหญ่แล้วปริมาณของวิตามินมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น

2. การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ บทบาทของแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหาร พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค ทำให้ผลิตภัณฑ์มีความปลอดภัยสูงขึ้นตลอดจนเก็บรักษาได้นานขึ้น โดยปัจจุบันหลักที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้ง คือ การสร้างกรด และการลดลงของค่าพีเอช กรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการเมทาบอลิซึมของแบคทีเรียทั้งกรดแลคติคและกรดอะซิตริก นอกจากนั้นยังมีสารประกอบอินทรีย์ชนิดอื่นๆ ที่เกิดขึ้น และมีผลในการยับยั้งการคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่น น้ำหนักโมเลกุล โครงสร้าง โมเลกุลสมบัติทางพันธุกรรม และสมบัติทางชีวเคมี

3. แบคทีเรียกรดแลคติคมีกิจกรรมในการลดปริมาณคอเลสเทอรอลในกระแสเลือด มีรายงานก่อนหน้านี้ของ Adam and Moss (1995) พบว่า การบริโภคผลิตภัณฑ์นมหมักจะช่วยยับยั้งการเกิดคอเลสเทอรอลได้ นอกจากนั้นยังมีผลในการลดน้ำหนักได้ประมาณ 2.3-2.7 กิโลกรัมภายใน 3 สัปดาห์ ซึ่งจะต้องบริโภคผลิตภัณฑ์พร้อมกับการออกกำลังกายอย่างสม่ำเสมอ นอกจากนั้น

ในโยเกิร์ตยังมีองค์ประกอบของสารที่ยับยั้งการสังเคราะห์คอเลสเทอรอล ดังนั้นการบริโภคผลิตภัณฑ์นมหมักที่มีเชื้อ *L. Acidophilus* จะช่วยให้คอเลสเทอรอลในเลือดลดลงกว่าการบริโภคนมที่ไม่มีเชื้อดังกล่าว การบริโภคคีเฟอร์ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์นมหมักประเภทหนึ่ง ซึ่งส่งผลดีต่อสุขภาพเพราะมีคุณค่าทางโภชนาการหลายประการ และยังส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันให้กับร่างกาย ช่วยให้ระบบการย่อยอาหารดีขึ้น โดยเฉพาะการย่อยแลคโทส

4. กิจกรรมในการป้องกันมะเร็งแบคทีเรียกรดแลคติคโดยเฉพาะ *L. acidophilus* เป็นแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับมะเร็งในลำไส้ใหญ่ การศึกษาถึงการบริโภคอาหารประเภทเนื้อแดง พบว่าทำให้ระดับของเอนไซม์ β-lucuronidase, azoreductase และเอนไซม์ introreductase เพิ่มสูงขึ้นกว่าการบริโภคอาหารประเภทผัก และเอนไซม์เหล่านี้ยังความเกี่ยวข้องกับการเพิ่มความเปลี่ยนแปลงของ procarcinogen ไปเป็น carcinogen ในส่วนปลายของลำไส้ของลำไส้ เชื้อ *L. acidophilus* สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์เหล่านี้ได้ ทำให้โอกาสเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งของผู้ป่วยลดลง

5. ช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกัน มีการศึกษาที่พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติคเป็นตัวกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยมีความไวต่อ microphage และ lymcocyte ทำให้เพิ่มระดับของ immunoglobulin (IgA) และผลิต gamma interferon ซึ่งผลดังกล่าวทำให้มีความต้านทานต่อเชื้อก่อโรค (pathogens) และยังมีคุณสมบัติเป็น antitumor โดยเฉพาะ *L. acidophilus*

2.2 สมุนไพรที่มีฤทธิ์ทางยา (Medicinal Plant)

สมุนไพรที่มีฤทธิ์ทางยา (Medicinal Plant) หรือไฟโตเทอราปิ (Phytotherapy) การใช้พืชสมุนไพรในการรักษาโรคมีประวัติมาอย่างยาวนานในพื้นที่ต่างๆ ทั่วโลก เช่น ในประเทศจีนมีแพทย์แผนจีน (Traditional Chinese Medicine; TMC) ซึ่งเป็นศาสตร์การแพทย์ที่มีประวัติศาสตร์ยาวนานกว่า 5,000 ปี ในประเทศญี่ปุ่นมีการใช้ยาสมุนไพรพื้นบ้านของญี่ปุ่น (Japanese Traditional Herbal Medicine) ที่โดยรวมเรียกว่าคัมโป (Kampo) โดยมีรากฐานมาจากการใช้ยาสมุนไพรจีน บางครั้งจึงอาจเรียกว่าเป็นยาพื้นบ้านจีนแบบญี่ปุ่น ส่วนในประเทศไทยเองก็มีแพทย์แผนไทย (Thai Traditional Medicine; TTM) ที่มีการใช้สมุนไพรในการรักษาบาบัดอาการของโรคต่างๆ (Tousuphap, 1998) ดังนั้น สมุนไพรจึงนับว่ามีความสาคัญอย่างยิ่งต่อการดำรงชีวิตของมนุษย์เราตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน การที่สมุนไพรมีสรรพคุณทางยาหรือใช้ในการรักษาโรค เนื่องจากสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) หรือสารพฤกษเคมี (phytochemical) ในสมุนไพรเหล่านั้นมีฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างใดอย่างหนึ่งหรือต่ออาการของโรค

พืชวงศ์ Zingiberaceae เป็นพืชสมุนไพรที่น่าสนใจอีกวงศ์หนึ่ง เนื่องจากมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียได้หลายชนิด รวมถึงสามารถหาได้ง่ายตามท้องถิ่น และสามารถปลูเองได้ในครัวเรือน

ทั่วไป ลักษณะโดยทั่วไปของพืชในวงศ์นี้คือมีลำต้นใต้ดินเป็นแง่หรือเหง้า มีกลิ่นหอม ใบเลี้ยงเดี่ยว เช่น ขิง ข่า ขมิ้น กระชาย ไพล เปาะหอม กะทือ กระวาน ฯลฯ และมักนิยมนำพืชในวงศ์ Zingiberaceae มาใช้ในการเพิ่มรสชาติของอาหารและเพิ่มสีสันในอาหาร อีกทั้งพืชในงวศ์ Zingiberaceae ยังมีสรรพคุณทางยามากมาย

2.2.1 กระชาย

กระชายเป็นพืชในวงศ์ Zingiberaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า Boesenbergia rotunda (L.) Mansf. หรือมีเรียกตามชื่อท้องถิ่นคือ กระแอม ระแอน (ภาคเหนือ) ขิงทราย (มหาสารคาม) จี๊ปู่ ซีพู (ไทยใหญ่แม่ฮ่องสอน) เป๊าซอเร้าะ เป๊าสี่ (กะเหรี่ยง – แม่ฮ่องสอน) ว่านพระอาทิตย์ (กรุงเทพฯ) มีลำต้นใต้ดิน เรียกว่า เหง้า (Rhizone) มีสีน้ำตาลแกมเทาจนถึงสีน้ำตาลแกมส้ม (ภาพที่ 2) มีส่วนเหนือดิน สูงประมาณ 30–40 เซนติเมตร ใบมีสีเขียวอ่อน รูปขอบขนานแกมรูปไข่ ส่วนยาวของตัวใบจะยาวเป็น 2 เท่าของความกว้างใบ เนื้อใบละเอียด กาบใบมีสีแดงหรือสีแดงปนเขียวอ่อน ดอกสีขาวอมชมพู กลีบเลี้ยงและกลีบดอกจะเชื่อมติดกัน เกสรตัวผู้มี 5–6 อัน แต่มีเพียงอันเดียวที่ปกติ ที่เหลือเป็นหมัน (male sterile) ผลเป็นแบบผลแห้ง เมื่อแก่แล้วจะไม่แตก (กระทรวงสาธารณสุขม 2541) ส่วนที่ใช้เป็นยาหรือประกอบอาหาร คือ เหง้าและรากทั้งสภาพสดและแห้ง ช่วงเวลาที่เก็บทำยาอายุประมาณ 5–6 เดือน กระชายเป็นพืชที่เป็นทั้งเครื่องเทศทั้งสมุนไพร

รูปภาพที่ 1 ลักษณะของกระชาย

ที่มา : https://www.thairath.co.th/lifestyle/health-and-beauty/2157156

สืบค้นวันที่ 19 กันยายน 2564

2.2.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกระชาย

1) ลำต้น กระชายเป็นพืชล้มลุกขนาดเล็กสูงประมาณ 2 เมตรเศษ มีลำต้นใต้ดินเรียกว่า เหง้า (rhizome) แต่ละเหง้ามีสีน้ำตาลแกมเทาจนถึงสีน้ำตาลแกมส้ม เหง้าใต้ดินนี้แตกออก

เป้นกระจุกจำนวนมาก โดยมีลักษณะอวบน้ำ ตรงกลางเหง้ามีลักษณะพองกว่าหัวท้าย เนื้อในมีสีเหลืองอ่อน มีกลิ่นหอมเฉพาะตัว

2) ใบ เป็นใบเดี่ยว ขนาดใหญ่ มีความยาวมากกว่าความกว้างประมาณ 2 เท่า ใบมีรูปใบใช่ ปลายใบแหลม ใบออกสลับกันแต่อยู่ในระนาบเดียวกัน ใบมีสีเขียวอ่อน ท้องใบมีสีแดง เนื้อใบละเอียดกาบใบมีสีแดงหรือสีแดงปนเขียวอ่อน

3) ดอก ออกเป็นช่อที่ส่วนยอด ออกแทรกอยู่ระหว่างก้านใบ ช่อดอกมีใบประดับเรียงทแยงกัน ดอกบานทีละดอกโดยที่อยู่ทางปลายช่อจะบานก่อน ดอกมีสีขาวหรือสีชมพูอ่อนหรือสีม่วงแดง ดอกมีลักษณะเป็นถุง กลีบเลี้ยงและกลีบดอกจะเชื่อมติดกัน เกสรตัวผู้มี 5 – 6 อัน แต่จะมีเพียงอันเดียวเท่านั้นที่ไม่เป็นหมัน

4) ผล เป็นแบบผลแห้ง เมื่อแก่แล้วไม่แตก

2.2.3 สายพันธุ์ของกระชาย

สายพันธุ์ของกระชายมือ 3 ชนิด คือ กระชายเหลือง กระชายดำ และกระชายแดง ประโยชน์ของกระชาย กระชายเป็นเครื่องเทศที่นิยมนำไปเป็นส่วนประกอบของเครื่องแกงมากกว่าทำอาหารประเภทอื่น นอกจากนี้ยังใช้เป็นยาหรือส่วนผสมของยา เนื่องจากกระชายมีรสเผ็ดร้อนและขม จึงถูกนำไปใช้แก้โรคในปาก เช่น ปากเปื่อยและปากเป็นแผล ใช้ขับลมและระดูขาว ขับปัสสาวะ บำรุงหัวใจ แก้กระษัย แก้เจ็บปวดบั้นเอว รักษางูสวัด นอกจากนี้ยังพบว่ากระชายประกอบด้วยสารพวกแคมเฟอร์มากถึงร้อยละ 32.10 จึงสามารถสกัดสารนี้ออกมาเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมเซลลูลอยด์ (celluloids) และสารประกอบของไนโตรเซลลูโลส (nitro-cellulose) อีกหลายชนิด

จากรายงานก่อนหน้านี้ของ หนูหีต วารีรัตน์, (2557) ศึกษาการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนบนผิวสัมผัส โดยใช้สารสกัดจากพืชตระกูลขิง โดยใช้ส่วนเหง้าสด 4 ชนิด ของพืชตระกูลขิง ได้แก่ ขิง ข่า กระชาย และขมิ้นขาว โดยการสกัดสารด้วยน้ำและเอทานอล และนำมาทดสอบการยับบั้งเชื้อแบคทีเรีย 4 ชนิด ได้แก่ *Staphylococus aureus, Bacillus cereus, Esherichia* และ *Psudomonas aeruginosa* ด้วยวิธี Agar well diffusion โดยทำการทดสอบที่ความเข้มข้นของสารสกัด คือ 100, 200, และ 300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า สารสกัดจากกระชายสามารถยับยั้งเชื้อ *B.cereus* ได้ดีที่สุด โดยค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimal Inhibition Concentration : MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (Minimal Bactericidal Concentration : MBC) เท่ากับ 0.05 และ 0.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

รายงานก่อนหน้านี้ของ Bhamarapravati et al, (2006) ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของกระชายขาว และจันทน์เทศหอม ต่อต้านเชื้อ *Helicobacter pylori* พบว่า การทดสอบฤทธิ์ต้าน H. pylori ในหลอดทดลอง โดยใช้จันทน์เทศหอม รากของกระชายขาว และกรดไดไฮโดรกัวเอเรติกนึ่งฆ่า

เชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อในเลือด had MIC เท่ากับ 125, 150, 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ MBC เท่ากับ 150, 175, 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สารประกอบทั้งสามมีฤทธิ์ต้าน *H. pylori* ในระดับเดียวกันกับยาที่ใช้ในปัจจุบันในการรักษาแผลในกระเพาะอาหาร ดังนั้น สารประกอบทั้งสามจาก B. rotunda และ M. fragrans จึงมีศักยภาพในการพัฒนายาต่อไป การทดลองในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าพืชและเครื่องเทศที่ใช้ในการแพทย์แผนไทยเพื่อรักษาอาการอาหารไม่ย่อยและแผลในกระเพาะอาหารมีสารประกอบที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *H. pylori* ในหลอดทดลอง ผลการวิจัยชี้ให้เห็นว่าส่วนผสมของอาหารไทยบางชนิดในอาหารปกติอาจมีส่วนทำให้อัตราการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหารในคนไทยต่ำลงโดยส่งผลต่อการเติบโตของเชื้อ *H. pylori*

การศึกษาก่อนหน้านี้ของ Zainin et al, (2013) ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากกระชายขาวต่อเชื้อ *Escherichia coli* ผลการวิจัยพบว่าสารสกัดกระชายขาวไวต่อเชื้อ *E. coli* ทุกสายพันธุ์ ซึ่งค่า MIC และ MBC ของสารสกัดกระชายขาว เทียบกับ *E. coli* อยู่ในช่วง 0.019 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.039มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร – 5.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งเส้นโค้งเวลาฆ่าถูกสร้างขึ้นที่ความเข้มข้น 0x MIC, 1/2x MIC, 1x MIC และ 2x MIC ของสายพันธุ์ *E. coli* ทั้งหมดสามารถฆ่าได้ด้วยความเข้มข้น 2x MIC หลังจาก 2 ชั่วโมง ผลการวิจัยพบว่าสารสกัดกระชายขาวมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียกับเชื้อ *E. coli*

2.3 ยาปฏิชีวนะและการดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรีย

2.3.1 ยาปฏิชีวนะและกลไกการออกฤทธิ์ของยา

ยาปฏิชีวนะเป็นยาที่ใช้ในการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งยาจะออกฤทธิ์โดยการรบกวนกระบวนการทำงานต่างๆ และทำลายโครงสร้างของแบคทีเรีย มีฤทธิ์ต่อเชื้อ 2 ประการ คือ ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (bactericidal) และยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (bacteriostatic) โดยแบคทีเรียเหล่านี้จะถูกทำลายด้วยระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายในเวลาต่อมา (Nathwani, 2018; Zaman et al., 2017) ซึ่งกลไกการออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะต่อเชื้อแบคทีเรียแบ่งออกเป็น 3 กลไกหลัก ดังต่อไปนี้

1. ทำลายผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย
2. ยับยั้งหรือรบกวนกระบวนการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก ได้แก่ ดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอ
3. ยับยั้งหรือรบกวนกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนภายในเซลล์แบคทีเรีย

โดยเป้าหมาย (target sites) ในการออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะจะมีผลต่อเซลล์แบคทีเรียและสิ่งแวดล้อมรอบแบคทีเรียเท่านั้น (specific for bacteria) ไม่มีผลต่อเซลล์ของมนุษย์ (Nathwani, 2018)

กลุ่มของยาปฏิชีวนะ โดยแบ่งตามกลไกการออกฤทธิ์เป็น 5 กลุ่ม ดังต่อไปนี้

1. ยาปฏิชีวนะที่มีผลยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรีย (cell wall synthesis inhibitors) ผนังเซลล์ของแบคทีเรียประกอบด้วย polysaccharide มาเชื่อมกันคล้ายโครงสร้างตาข่าย เรียกว่า peptidoglycan ยาจะยับยั้งกระบวนการสร้างผนังเซลล์ โดยยาจะจับกับ penicillin binding proteins (PBPs) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิด crosslinking ของสาย peptidoglycan (Kapoor et al., 2017) ยาในกลุ่มนี้ ได้แก่ penicillins, cephalosporins, carbapenems, monobactams และ glycopeptides

2. ยาปฏิชีวนะที่มีผลยับยั้งการทำหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย (inhibitors of membrane function) ห่อหุ้มเซลล์ หรือ cytoplasmic membrane ทำหน้าที่ปกคลุมไซโตพลาซึม ควบคุมการผ่านเข้า-ออกของสารภายในและภายนอกเซลล์ของแบคทีเรีย เมื่อเยื่อหุ้มเซลล์ถูกรบกวนการทำงานหรือสูญเสียหน้าที่ สารต่างๆจะไหลออกจากเซลล์เป็นผลให้เซลล์แบคทีเรียเกิดการตาย (Ullah & Ali, 2017) ยาในกลุ่มนี้ ได้แก่ polymyxins

3. ยาปฏิชีวนะที่มีผลยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน (protein synthesis inhibitors)

กระบวนการสังเคราะห์โปรตีนในเซลล์แบคทีเรียเป็นกระบวนการที่สำคัญเช่นเดียวกับเซลล์มนุษย์ซึ่งไรโบโซมจะทำหน้าที่สร้างโปรตีนในแบคทีเรียจะพบไรโบโซมชนิด 70S ประกอบด้วยหน่วยย่อย 30S และ 50S ซึ่งหน่วยย่อยทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นเป้าหมายหลักของยา (Ullah & Ali, 2017)

- ยาปฏิชีวนะที่ยับยั้งไรโบโซมหน่วยย่อยชนิด 30S ได้แก่ aminoglycosides และ tetracyclins

- ยาปฏิชีวนะที่ยับยั้งไรโบโซมหน่วยย่อยชนิด 50S ได้แก่ macrolides, clindamycin, linezolid, streptogramins และ chloramphenicol

4. ยาปฏิชีวนะที่มีผลยับยั้งการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก (nucleic acid synthesis inhibitors) กรดนิวคลีอิกในเซลล์แบคทีเรีย ประกอบด้วย DNA และ RNA ยาปฏิชีวนะที่มีผลยับยั้งการสังเคราะห์ RNA จะรบกวนกระบวนการ transcription ส่งผลให้ไม่เกิดการสร้าง mRNA เมื่อไม่มี mRNA เกิดขึ้นจะไม่มีการสร้างโปรตีนเกิดขึ้นในลำดับถัดไป ยาในกลุ่มนี้ ได้แก่ rifampin ส่วนยาปฏิชีวนะที่มีผลยับยั้งการสังเคราะห์ DNA มีกลไกการออกฤทธิ์โดยยาจะยับยั้งการทำงานของ DNA gyrase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการคลายตัวของเกลียว DNA ในระหว่างที่มีการจำลองตัวของ DNA เมื่อเอนไซม์ DNA gyrase ถูกยับยั้ง ส่งผลให้เกิดภาวะเครียดในเซลล์ และเซลล์แบคทีเรียตายใน

ที่สุด ยาในกลุ่มนี้ ได้แก่ quinolones (Ullah & Ali, 2017) หรือยาบางชนิดมีผลต่อ DNA โดยตรง เช่น metronidazole ซึ่งเป็นยาในรูปที่ไม่ออกฤทธิ์ (prodrug) เมื่อยาเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียจะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปที่ออกฤทธิ์ เกิดอนุมูลอิสระไนโตร

5. ยาปฏิชีวนะที่มีผลยับยั้งกรดโฟลิก (folic acid metabolism inhibitors) กรดโฟลิกเป็นสารที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสำคัญในแบคทีเรีย ซึ่งทำหน้าที่เป็น cofactor ในกระบวนการสังเคราะห์ DNA เมื่อยาไปยับยั้งการสร้างและการทำงานของกรดโฟลิก ส่งผลให้การสร้างสารพันธุกรรมของแบคทีเรียถูกรบกวนเซลล์ แบคทีเรียหยุดการเจริญเติบโต (Sharon & Gavin, 2015) ยาในกลุ่มนี้ ได้แก่ sulfonamides และ trimethoprim

2.4.2 เชื้อแบคทีเรียดื้อยาปฏิชีวนะ

การดื้อยาปฏิชีวนะ (antibiotic resistance) คือ การที่ยาปฏิชีวนะมีความสามารถในการทำลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียลดลง ความไวของยาต่อเชื้อลดลง (less sensitivity) เนื่องมาจากการปรับตัวของแบคทีเรียต่อยาด้วยหลากหลายกลไกทำให้ใช้ยาปฏิชีวนะตัวเดิมไม่ได้ผล จำเป็นต้องหายาตัวใหม่มาใช้ในการรักษา (Zaman et al., 2017) ซึ่งปัจจุบันปัญหาแบคทีเรียดื้อยามีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น ตั้งแต่การค้นพบ penicillin ในช่วงทศวรรษที่ 1920 ปี ค.ศ. 1928 โดย Sir Alexander Fleming ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะตัวแรกได้มีการนำยา penicillin มาใช้ในการรักษาการติดเชื้อแบคทีเรีย นับเป็นประโยชน์มหาศาลในการรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย ทำให้อัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยจากการติดเชื้อเพิ่มมากขึ้น จนกระทั่งปี ค.ศ. 1943 เริ่มพบเชื้อที่ดื้อต่อยา penicillin ซึ่งในช่วงเวลาดังกล่าวมีการค้นพบยาปฏิชีวนะตัวใหม่ ๆ เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง เช่น cephalosporins, carbapenems และ fluoroquinolones เป็นต้น แต่ในขณะเดียวกันแบคทีเรียจะเกิดการปรับตัวเพื่อการมีชีวิตรอดอยู่ตลอดเวลาเมื่อได้รับยาปฏิชีวนะที่ไม่เหมาะสมจนเกิดการดื้อต่อยา ยกตัวอย่างเช่น vancomycinresistant enterococci (VRE), carbapenemresistant enterobacteriaceae (CRE) และ methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อแบคทีเรียบางชนิด เช่น Escherichia coli และ Klebsiella pneumoniae จะสร้างเอนไซม์ beta-lactamases มาทำลายยากลุ่ม beta-lactams (extended spectrum beta-lactamases; ESBL) ส่งผลให้เกิดการดื้อยากลุ่มดังกล่าวในแบคทีเรียแกรมลบ(gram negative bacteria) (Ruh et al., 2019; Ur Rahman et at., 2018) นับตั้งแต่เริ่มมีการใช้ยา penicillin พบว่า Escherichia coli เป็นแบคทีเรียแกรมลบชนิดแรกที่มีการสร้าง beta-lactamases มาทำลายยา (Day et al., 2019) จะเห็นได้ว่าการดื้อยาปฏิชีวนะเกิดขึ้นมาเป็นเวลาช้านาน (Zaman et al., 2017) ซึ่งเชื้อแบคทีเรียดื้อต่อยาปฏิชีวนะนับเป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขที่ต้องได้รับการป้องกันและควบคุมการเกิดการดื้อยาดังกล่าวอย่างเคร่งครัด

2.3.3 กลไกการดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรีย

การดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรีย เกิดจากแบคทีเรียมีการปรับตัวต่อยาปฏิชีวนะที่ได้รับเพื่อความอยู่รอดด้วยกลไกต่าง ๆ ดังนี้

1. intrinsic resistance คือ การที่ยาปฏิชีวนะบางชนิดไม่สามารถทำลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบางชนิดได้ เนื่องจากธรรมชาติของแบคทีเรียชนิดนั้นไม่มี target sites สำหรับยาปฏิชีวนะ (Dowling et al., 2011) เช่น ยาในกลุ่ม beta-lactams ไม่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ (gram positive bacteria) เนื่องจากแบคทีเรียแกรมบวกไม่มี penicillin binding protein (PBP) ซึ่งเป็นเป้าหมายของยา หรือยา metronidazole ไม่สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจน (aerobic bacteria) เนื่องจากแบคทีเรียเหล่านี้ไม่สามารถเปลี่ยนยาให้อยู่ในรูปออกฤทธิ์ได้ (Day et al., 2019)

2. acquired resistance เมื่อได้รับยาปฏิชีวนะที่ไม่เหมาะสม ทำให้เชื้อแบคทีเรียมีกลไกการปรับตัวต่อยาปฏิชีวนะที่ได้รับ เพื่อการมีชีวิตรอด ส่งผลให้เกิดการดื้อยาตามมาและการใช้ยาปฏิชีวนะต่อเชื้อที่ดื้อจึงไม่ได้ผล โดยแบคทีเรียบางชนิดอาจใช้หลายกลไกร่วมกันในการดื้อยา ซึ่งแบ่งออกเป็นกลไกย่อย ดังนี้ (Dowling et al., 2011; Munita & Arias, 2015; Peterson rt al., 2018)

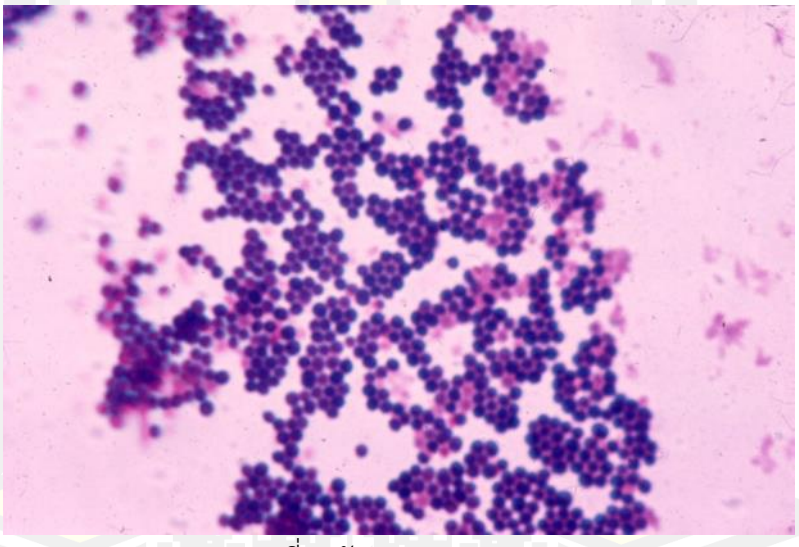
- แบคทีเรียสร้างเอนไซม์มาทำลายยา (drug inactivation / modification) เช่น แบคทีเรียกลุ่ม gram negative bacilli สร้าง beta-lactamase มาทำลายพันธะที่เชื่อมเป็น beta-lactam ring ของยาเพนิซิลลิน

- ลดการนำยาเข้าสู่ภายในเชื้อแบคทีเรียและมีการสร้าง efflux pumps เพื่อขับยาออกจากแบคทีเรีย ทำให้ปริมาณยาในแบคทีเรียลดลง จึงเกิดการดื้อยาตามมา โดย efflux pumps จะแบ่งออกเป็น 5 กลุ่มใหญ่ (Munita & Arias, 2015; Sharma et al., 2019) ดังนี้ ATP-binding cassette (ABC) superfamily, major facilitator superfamily (MFS), multidrug and toxic-compound extrusion (MATE) family, small multidrug resistance (SMR) family และ resistance nodulation division (RND) family เช่น Escherichia coli และแบคทีเรียแกรมลบอื่น ๆ ส่วนใหญ่จะสร้าง AcrAB-TolC ซึ่งเป็น efflux pump ที่อยู่ใน RND family (Soto, 2013; Alibert et al., 2017)

- แบคทีเรียมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเป้าหมายยา (alteration of target site) เช่น การดื้อต่อยา methicillin ใน MRSA มีกลไกการดื้อยาจาก PBP ถูกสร้างขึ้นใหม่เปน PBP2a ซึ่งมีโครงสร้างต่างจาก PBP โดยการสร้าง PBP2a ถูกกำหนดโดยยีน mecA ที่อยู่บน staphylococcal chromosome cassette mec (SCCmec) ของ MRSA ทำให้ยาปฏิชีวนะไม่สามารถไปจับกับ PBP ได้ หรือจับได้น้อยลง จึงออกฤทธิ์ทำลายแบคทีเรียไม่ได้ ส่งผลให้เชื้อเกิดการดื้อยา (Sharon & Gavin, 2015)

2.4 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม มักอยู่รวมกันเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น (ภาพที่ 1) โดยทั่วไปแบคทีเรีย *S. aureus* สามารถทนต่อสภาวะแวดล้อมต่างๆได้ดี เช่น เชื้อสามารถทนความร้อนได้ถึง 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีและมีชีวิตอยู่ในที่เย็น 4 องศาเซลเซียส ได้เป็นเวลานานหลายเดือน ซึ่งโดยปกติแล้วเชื้อนี้จัดเป็นแบคทีเรียประจำถิ่น (normal microbiota) ของร่างกาย มักจะอยู่ตามผิวหนังและเยื้อบุกเมือกของร่างกาย เช่น บริเวณลำคอส่วน oropharynx และ nasopharynx โดยไม่ทำให้เกิดการติดเชื้อ แต่อย่างไรก็ตาม แบคทีเรีย Staphylococcus aureus มีสามารถทำให้เกิดโรคได้หลายรูปแบบ เช่น เกิดฝี ตุ่มหนอง ทำให้เกิดการติดเชื้อที่ผิวหนัง ที่แผลหรือการติดเชื้อที่รุนแรงอื่นๆ ได้แก่ การติดเชื้อที่ตำแหน่งผ่าตัด การติดเชื้อในกระแสเลือด เยื้อบุหัวใจอักเสบ เยื้อหุ้มสมองอักเสบ ปวดบวม การติดเชื้อของกระดูกและทางเดินปัสสาวะ ปอดอักเสบ การติดเชื้อในกระแสเลือด เป็นต้น ปัจจัยที่ทำให้เชื้อก่อโลกได้ คือ โครงสร้างเซลล์ การสร้างสารพิษ การสร้างเอนไซม์ ซึ่งเป็นผลทำให้เชื้อเจริญและแพร่กระจายไปยังส่วนต่างๆ พร้อมทั้งมีการทำลายเนื้อเยื้อของผู้ป่วย (นิตยา และคณะ 2015)



รูปภาพที่ 2 ลักษณะของ *S. aureus*
ที่มา : (Asadi & Jamali., 2017)

S. aureus เป็นเชื้อก่อโรคที่พบได้บ่อยในโรคติดเชื้อในโรงพยาบาล เช่น โรคติดเชื้อที่ผิวหนัง การเกิดตุ่มหนองที่ผิวหนัง ฝี ฝีฝักบัว บางสายพันธุ์สามารถสร้างสารพิษ (exfoliative toxin ET) ที่ทำให้เกิดโรคผิวหนังหลุดลอกที่เรียกว่า Staphylococcal scalded skin syndrome โรคปอดบวม (Staphylococcal pneumonia) การติดเชื้อที่กระดูก (osteomyelitis) และข้อ (pyoarthrosis) โรคอาหารเป็นพิษจากเอนเทอโรทอกซิน แบคทีเรีย *S. aureus* บางสายพันธุ์ทำให้เกิดกลุ่มอาการ toxic-shocksyndrome โดยการสร้าง toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) ทำให้ผู้ป่วยมีไข้สูง

คลื่นไส้อาเจียน มีความดันโลหิตต่ำ มีผื่นแดง การทำงานของไตมักจะล้มเหลวและเกิดอาการช็อคในที่สุด (Brewer et al., 2008) โดยทั่วไปวิธีการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ทำได้โดยการให้ยา Penicillin แต่ต่อมามีรายงานพบเชื้อ *S. aureus* ที่ดื้อต่อ Penicillin โดยการสร้างเอนไซม์ beta-lactamase และมีจำนวนรายงานเพิ่มสูงขึ้น ทำให้มีการพัฒนายา Methicillin ซึ่งมีความทนต่อเอนไซม์ beta-lactamase ของ *S. aureus* แต่มีการรายงานพบ *S. aureus* ที่ไวต่อยา Methicillin เรียกว่า Methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) ต่อมามีรายงานพบว่าเชื้อ *S. aureus* ดื้อยา Methicillin ซึ่งเรียกว่า “Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) (Hartman & Tomasz, 1984) เชื้อแบคทีเรีย MRSA บางกลุ่มนี้ยังสามารถสร้างเอนไซม์ beta-lactamaseมาทำลายโครงสร้าง beta-lactam ของยาปฏิชีวนะในกลุ่มนี้ เช่น Oxacillin ซึ่งเรียก *S. aureus* สายพันธุ์นี้ว่า“borderline Oxacillin resistant *S. aureus* (BORSA)” การรักษาโรคติดเชื้อจากแบคทีเรียกลุ่มนี้ต้องให้ยาปฏิชีวนะร่วมกัน เช่น Ampicillin/Sulbactam และ Amoxicillin/Clavulanate เป็นต้น ในปัจจุบันมีการรายงานพบแบคทีเรียกลุ่ม MRSA ดื้อต่อยา Vancomycin เรียกแบคทีเรียกลุ่มนี้ว่า Vancomycin intermediate *S. aureus* (VISA)

อุบัติการณ์การดื้อยาเพนนิซิลิน (penicillin) ของแบคทีเรีย *S. aureus* เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึง ค.ศ. 1948 ซึ่งไม่สามารถใช้ยาเพนนิซิลินในการรักษาโรคติดต่อเชื้อที่มีสาเหตุมาจากแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ได้ หลังจากนั้นมีการค้นพบ penicillin precursor ชนิด 6-amino penicilanic acid ในปี ค.ศ. 1959 ทำให้ สามารถผลิตยาเพนนิซิลินกึ่งสังเคราะห์โดยการดัดแปลงตำแหน่ง acyl side chain ซึ่งมีผลให้สามารถป้องกันการย่อยสลายของวงบีต้า-แลคเทมโดยเอนไซม์บีต้า-แลคเทมเมส ซึ่งยา methicillin และ isoxazolyl penicillin ตัวแรก คือยา oxacillin ได้ถูกนำมาใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococci* ในปี ค.ศ. 1960 แต่ในปี ค.ศ.1961 ก็เริ่มพบว่ามีการดื้อยา penicillinase-resistant penicillin โดยพบในแบคทีเรีย *S. aureus* ร้อยละ 0.04-0.2 และได้มีการเรียกแบคทีเรียดังกล่าวว่า Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) หลังจากนั้นปัญหาของแบคทีเรีย MRSA เพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ มีรายงานเกี่ยวกับแบคทีเรีย MRSA จากส่วนต่างๆของโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในทวีปยุโรป (Humphrey et al., 1997)

2.6 Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus (MRSA) เป็นเชื้อที่ดื้อต่อเมธิซิลลินกลายเป็นเชื้อก่อโรคในมนุษย์ที่มีความสำคัญมากขึ้นเรื่อยๆ นับตั้งแต่มีคำอธิบายเริ่มต้นในปี 2504 ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อทั่วโลก ในปัจจุบันได้กลายเป็นแบคทีเรียก่อโรคที่เด่นและร้ายแรง ซึ่งนำไปสู่การเจ็บป่วยและอัตราการเสียชีวิตสูง MRSA มักมียีนที่ดื้อต่อยาหลายชนิด ซึ่งทำให้ดื้อต่อ เบต้า-แลคตัม อะมิโนไกลโคไซด์ ฟลูออโรควิโนโลน และแมคโครไลด์ มีความไวต่อไกลโคเปปไทด์เท่านั้น เช่น vancomycin และ

teicoplanin ที่ถือว่าเป็นสารออกฤทธิ์สองสามตัวสุดท้าย การติดเชื้อ MRSA คาดว่าจะส่งผลกระทบต่อผู้ป่วยมากกว่า 150,000 รายต่อปี ในสหภาพยุโรป (EU) ส่งผลให้มีค่าใช้จ่ายเพิ่มเติมในโรงพยาบาล 380 ล้านยูโรสำหรับระบบการดูแลสุขภาพของสหภาพยุโรป ข้อมูลการเฝ้าระวังทั่วยุโรปเกี่ยวกับการติดเชื้อในกระแสเลือดแสดงให้เห็นความแปรปรวนที่ชัดเจนในกลุ่มประเทศสมาชิกสหภาพยุโรปในสัดส่วนของเชื้อ *S. aureus* ที่ดื้อต่อ methicillin ตั้งแต่น้อยกว่า 1% ถึงมากกว่า 50% ในช่วงห้าปีที่ผ่านมา อัตราแบคทีเรีย MRSA ได้ลดลงอย่างมีนัยสำคัญใน 10 ประเทศในสหภาพยุโรปที่มีอัตราการติดเชื้อ MRSA เฉพาะถิ่นที่สูงขึ้น นอกเหนือจากการติดเชื้อที่เกี่ยวข้องกับการดูแลสุขภาพ สายพันธุ์ MRSA ใหม่ได้เกิดขึ้นเมื่อเร็ว ๆ นี้ในฐานะชุมชนและเชื้อโรคในมนุษย์ที่เกี่ยวข้องกับปศุสัตว์ในประเทศสมาชิกสหภาพยุโรปส่วนใหญ่ การป้องกันและควบคุม MRSA ได้รับการระบุว่าเป็นลำดับความสำคัญด้านสาธารณสุขในสหภาพยุโรป ในการตรวจสอบนี้ เราอธิบายภาระปัจจุบันของการติดเชื้อ MRSA ในสถานพยาบาลและการตั้งค่าชุมชนทั่วยุโรป และสรุปภัยคุกคามหลักที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงล่าสุดในด้านระบาดวิทยา ซึ่งมักพบเชื้อ MRSA ที่แยกได้ทางคลินิกโดยเฉพาะในผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาในหอผู้ป่วยหนัก (ICU) และในผู้สูงอายุและเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลซ้ำแล้วซ้ำเล่า มีความจำเป็นเร่งด่วนในการพัฒนาสารต่อต้านเชื้อ MRSA ด้วยกลไกการออกฤทธิ์แบบใหม่ (Barrett, 2005; Berger and Rohrer, 2002; Deurenberg et al., 2007; Goldstein, 2007)

จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Zuo et al, (2008) ศึกษาพืชสมุนไพรจีนเพื่อยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* (MRSA) พบว่า พืชที่ใช้ในการทดลองทั้งหมด 19 ชนิด ซึ่งแสดงฤทธิ์ต้าน MRSA โดยมี MIC 1.25–3.07 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยพืชที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพมากที่สุด ได้แก่ *Dendrobenthamia capitata*, *Elsholtzia rugulosa*, *Elsholtzia blanda*, *Geranium strictipes* และ *Polygonum multiflorum* (MIC≤1.43 mg/ml) และกรดเบทูลินิกที่แยกได้จากเศษส่วนเอทิลอะซิเตตที่ใช้ในการสกัด *Dendrobenthamia capitata* ด้วยค่า MIC/MBC เป็น 62.5/125.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Chomnawang et al, (2009) ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสมุนไพรไทยต่อเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อต่อเมธิซิลลิน พบว่า พืชสมุนไพรไทยทั้งหมด 17 ชนิด ที่นำมาศึกษามีฤทธิ์ต้านเชื้อ MRSA และพืชสมุนไพรที่สามารถยับยั้งเชื้อ MRSA ได้ดีที่สุดคือ มังคุด และกิจกรรมของมังคุดถูกโยงไปถึงแซนโทนพรีไนเลต, α-mangostin (ค่า MIC และ MBC ที่ 1.95 และ 3.91 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ)

การศึกษาก่อนหน้านี้ของ Wikaningtyas & Sukandar, (2016) ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของพืช และฤทธิ์การต้านแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างทางคลินิก พบว่า ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ดีที่สุดซึ่งคำนวณจากค่าความเข้มข้นในการยับยั้งขั้นต่ำเทียบกับ MRSA โดยสารสกัด *Kaempferia pandurata* (Roxb) (K. pandurata) มีค่า MIC เท่ากับ 256 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัด

Senna alata (S. alata) เท่ากับ 512 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งในใบของ *S. alata* แห้ง และสารสกัดที่สกัดจากใบมีสารฟลาโวนอยด์ อัลคาลอยด์ ซาโปนิน ควิโนน แทนนิน และสเตอรอล ในขณะที่ *K. Pandurate* แห้งและสารสกัดนั้น พบว่า มีสารฟลาโวนอยด์ และสเตอรอลหรือไตรเทอร์พีนอยด์

2.7 อนุมูลอิสระ (Free redicals)

อนุมูลอิสระ (Free redicals) หมายถึง สารที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว (Unpaired electrons) ในอะตอมหรือโมเลกุล พบได้ทุกแห่งทั้งในสิ่งแวดล้อมในสิ่งมีชีวิต และในเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกระบวนการการผลิตพลังงานภายในเซลล์ หรือจากกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) โดยมีการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนออกจากโมเลกุลของออกซิเจน ทำให้อิเล็กตรอนในโมเลกุลออกซิเจนไม่สมดุล กลายเป็นอนุมูลอิสระและว่องไวในการเข้าทำปฏิกิริยามาก และสามารถดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นมาแทนที่อิเล็กตรอนที่ขาดหายไปเพื่อให้ตัวเองเกิดสมดุลหรือเสถียร ซึ่งปฏิกิริยานี้เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ และเกิดขึ้นในเซลล์ตลอดเวลา (ดังสมการ 1 และ 2)

R• +O2 —> ROO• ..... สมการ 1

ROO• + RH —> ROOH + R•..... สมการ 2

อนุมูลอิสระที่สำคัญที่สุดที่เกิดในเซลล์ที่ใช้ออกซิเจน ได้แก่ oxygen radical, อนุพันธ์ของ oxygen redical (เช่น superoxide radical และ hydroxyl radical), hydrogen peroxide, transition metals (โลหะทรานซิชัน), carbonate radical (CO_3•), nitrate radical (NO_3•), methyl radical (CH_3•), superoxide radical (O_2•), peroxyl radical (ROO•), reactive oxygen species (ROS) เป็นต้น (Halliwell, B., 1999) นอกจากนี้อนุมูลอิสระสามารถทำลายชีวโมเลกุลทุกประเภททั้งในเซลล์และส่วนประกอบเซลล์สิ่งมีชีวิต เช่น ลิพิด (lipid) โปรตีน (protein) เอนไซม์ (enzyme) ดีเอ็นเอ (DNA) อาร์เอ็นเอ (RNA) คาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate) เซลล์เมมเบรน (cell membrane) คอลลาเจน (Callagen) ไมโตคอนเดรีย (mitocondria) และเนื้อเยื่อเกี่ยวกัน (connective tissues) ซึ่งเป็นสาเหตุให้เซซล์ตาย การเกิดการกลายพันธุ์ของดีเอ็นเอในเซลล์ และก่อให้เกิดโรคต่างๆ ได้แก่ โรคชรา (aging) โรคมะเร็ง (cancer) โรคหัวใจขาดเลือด (coronary heart disease) โรคความจำเสื่อม (Alzheimer,s disease) โรคข้ออักเสบ (arthritis) โรคภูมิแพ้ (allergies) โรคความดันโลหิต โรคเหงือก โรคเกี่ยวกับสายตา ความผิดปกติของปอดและระบบประสาท โรคเกี่ยวกับทางเดินหายใจ โรคเกี่ยวกับความผิดปกติของผิวหนัง และโรคลำไส้อักเสบเป็นต้น (Ames, Shigenaga, & Hagen, 1993) อนุมูลอิสระนอกจากจะเกิดภายในสิ่งมีชีวิตแล้วอนุมูลอิสระสามารถเกิดจากภายนอกสิ่งมีชีวิตหรือในสิ่งแวดล้อม ได้แก่ การได้รับเชื้อโรค เช่น การติดเชื้อโรคไวรัสหรือเชื้อแบคทีเรีย โรคเกี่ยวกับภูมิคุ้มกัน (immune diseases) เช่น ข้ออักเสบ รูมาตอยด์ เป็นต้น จากรังสี เช่น รังสีอัลตราไวโอเลต รังสีเอ็กซ รังสีแกรมมา จากมลภาวะ เช่น ควันบุหรี่ แก๊สจากท่อไอเสีย เช่น ไนตรัสออกไซด์ ไนโตรเจน

ไดออกไซด์ เขม่าจากเครื่องยนต์ ฝุ่นจากกระบวนการประกอบอาหาร เช่น การย่างเนื้อสัตว์ที่มีส่วนประกอบของไขมันสูง การนำน้ำมันที่ใช้ทอดอาหารที่อุณหภูมิสูงๆ กลับมาใช้อีก การทำให้เกิดอาหารประเภทเกรียมไหม้หรือเกิดจากการปิ้งย่าง จากยาบาง ชนิด เช่น โดโซรูบิซิน (doxorubicin) เพนนิซิลลามิน (penicillamine) พาราเซตามอล (paracetamol) (ไมตรี สุทธจิตต์, 2555)

2.8 สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants)

สารต้านอนุมูลอิสระถือว่ามีความสำคัญต่อกระบวนการการออกซิไดซ์อนุมูลอิสระ หรือสามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยในสิ่งมีชีวิตจะมีระบบการป้องกันการทำลายเซซล์และเนื้อเยื่อจากอนุมูลอิสระ ประกอบด้วยสารต้านอนุมูลอิสระมากมายหลายชนิดที่ทำหน้าที่แตกต่างกันไป ซึ่งมีทั้งที่เป็นเอนไซม์และไม่เป็นเอนไซม์ สารประกอบที่ละลายในน้ำและสารประกอบที่ละลายในไขมัน โดยสารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้มีกลไกการทำงานต้านอนุมูลอิสระ (radical scavengine) การยับยั้งการทำงานของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน (singlet oxygen quenching) จับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชั่นได้ (metal chelation) หยุดปฏิกิริยาการส้รางอนุมูลอิสระ (chain - breaking) เสริมฤทธิ์ (synergism) และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (enzyme inhibition) ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ เป็นต้น ตัวอย่างแสดงการดักจับอนุมูลอิสระดังสมการที่ 3 และ 4 (เจนจิรา จิรัมย์ และประสงค์ สีหานาม, 2554)

$R^{\bullet}$ + AH —> RH + $A^{\bullet}$ .....สมการ 3

$RO^{\bullet}$ + AH —> ROH + $A^{\bullet}$ ..... สมการ 4

โดย $R^{\bullet}$ และ $RO^{\bullet}$ คือ อนุมูลอิสระ และ AH คือสารต้านอนุมูลอิสระ

แหล่งที่มาของสารต้านอนุมูลอิสระมี 2 แหล่ง ได้แก่ สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (synthetic antioxidants) และสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (natural antioxidants) ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์เกิดจากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี โดยเป็นสารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ Propyl gallate, 2-butylated hydroxyanisole, 3-butylate hydroxyanisole, BHT (butylated hydroxytoluene) และ tertiary butylhydroquinone สารสังเคราะห์ดังกล่าวนิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันที่เป็นสาเหตุที่ทำให้อาหารมีกลิ่น สี และรสชาติเปลี่ยนแปลงไปสารสังเคราะห์นี้มีสภาพคงตัวกว่าสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติแต่มีข้อจำกัดในด้านความปลอดภัยในการบริโภค (Pokormy et al., 2001) ขณะที่สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติสามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตทั้งพืชและสัตว์ ซึ่งเป็นได้ทั้งเอนไซม์ วิตามินและสารอื่นๆ ตัวอย่างของสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นวิตามิน เช่น vitamin C (เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ไซโตพลาสซึม) vitamin E (เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่เมมเบรน) และ glutathione (เป็นสารต้าน

อนุมูลอิสระที่ป้องกันอันตรายจากอนุมูลอิสระที่ไซโตพลาสซึมและเมมเบรน) ส่วนสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นเอนไซม์ ได้แก่ glutathione peroxidase (GPX), glutathione reductase และ glutathione transferase ซึ่งทำหน้าที่ทำให้โมเลกุลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เป็นออกซิเจนและน้ำ ส่วนเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) สามารถเปลี่ยน $O_2^{\bullet}$ เป็น H_2O_2 สารต้านอนุมูลอิสระอื่นๆ ได้แก่ carotenoids และ ubiquinones เป็นสารต้านอนุมูลอิสระสามารถป้องกันอนุมูลอิสระออกซิเจนทั้งภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ (บุหรัน พันธุ์สุวรรค์ และคณะ 2553) ในภาวะปกติร่างกายของคนเราจะมีการป้องกันการสะสมสารอนุมูลอิสระโดยการสร้างเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระขึ้นมาควบคุมปริมาณสารอนุมูลอิสระให้อยู่ในภาวะที่สมดุล และอีกส่วนได้จากจากสารต้านอนุมูลอิสระที่ร่างกายรับประทานเข้าไปจำพวกวิตามิน เบต้าแคโรทีน และแคโรทีนอยด์ รวมทั้งสารประกอบโพลีฟีนอล ซึ่งสารดังกล่าวได้จากพืชผักและผลไม้ (เจนจิรา จิรัมย์ และประสงค์ สีหานาม ., 2554) ตัวอย่างอาหารที่มีเบต้าแคโรทีนสูง ได้แก่ ผักใบเขียว เช่น ตำลึง และผักบุ้ง อาหารที่มีสีเหลือง เช่น แครอท มะละกอสุก มะม่วงสุก มะเขือเทศ ฟักทอง อาหารที่มีวิตามินซี (vitamin C หรือ ascorbic acid) สูง ได้แก่ พืช ผักสีเขียว และผลไม้รสเปรี้ยว ส้ม มะนาว สับปะรด (วิตามินซีจากพืชผักดังกล่าวมีฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระที่แรงมากและละลายน้ำได้ดี) วิตามินอี (vitamin E หรือ tocopherol) ละลายได้ดีในน้ำมัน โดยวิตามินอีในน้ำมันจากเมล็ดพืชชนิดต่างๆ เช่น รำละเอียดในพวกธัญพืชที่ไม่ขัดขาว ข้าวโพด ข้าวกล้อง ถั่วแดง ถั่วเหลือง ผักกาดหอม เมล็ดทานตะวัน งา น้ำมันรำ (บุหรัน พันธุ์สวรรค์, 2556)

2.9 สารประกอบฟีโนลิก (phenolic compounds)

สารประกอบฟีนอลิกจัดเป็นสารต้านอนุมูลที่ได้รับจากภายนอกและพบได้มากในธรรมชาติ ได้แก่ พืชผัก ผลไม้ ชาเขียว ชาดำ ช็อกโกแลต และไวน์แดง เป็นต้น โดยในธรรมชาติสามารถพบสารประกอบฟีนอลิกมากกว่า 8,000 ชนิด (Rice-evans et al., 1995) ซึ่งเป็นสารทุติยภูมิที่สร้างขึ้นโดยพืชโดยมีโครงสร้างประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซีเกาะอยู่กับวงแหวนเบนซีน สามารถจำแนกชนิดของสารประกอบฟีโนลิกเป็นกลุ่มต่างๆ ได้ดังต่อไปนี้

1) กลุ่มกรดฟีโนลิกที่มาจาก hydroxybenzoic acids ได้แก่ gallic acid และกรดฟีโนลิกที่มาจาก hydroxycinnamic acid ได้แก่ caffeic, ferulic และ coumaric acid

2) กลุ่มฟลาโวนอยด์เป็นกลุ่มใหญ่ ประกอบด้วยกลุ่ม ฟลาโวนส์ไอโซฟลาโวนส์ฟลาโวนอลส์ แอนโธไซยานินส์และฟลาวานอลส์

3) กลุ่มสติลบีน (stilbenes)

4) กลุ่มลิกนินส์และโพลีเมอร์ของลิกนินส์สารประกอบฟีโนลิกพบมากในผลไม้ผัก และเครื่องดื่ม ร่างกายจะได้รับสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่พบมากในอาหารจะอยู่ในกลุ่มฟลาโวนอลส์เช่น คาร์ทิชินส์และโปรแอนโธไซยานิดินส์ และกลุ่มแอนโธไซยานินส์ (ลือชัย บุตคุป, 2011)

สารประกอบฟีนอลิกที่เป็นโมเลกุลอย่างง่าย ได้แก่ กรดฟีนอลิก ฟีนิลโปรพานอยด์ และฟลาโวนอยด์ ไปจนถึงโครงสร้างโพลิเมอร์ที่ซับซ้อน เช่น ลิกนิน เมลานิน และแทนนิน เป็นต้น สารโพลีฟีนอลิกเป็นสารที่บทบาทสำคัญเนื่องจากมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ต้านไวรัส ต้านการอักเสบ ต้านการแพ้ และมีคุณสมบัติในการสลายลิ่มเลือด รวมเป็นสารต้านการก่อมะเร็ง และสามารถลดความดันโลหิตในการสลายลิ่มเลือด เหล่านี้เป็นต้น ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวนี้มีความสัมพันธ์กับคุณสมบัติ การเป็นสารต้านอนุมูลโครงสร้างทั่วไปของสารประกอบฟีนอลิก ประกอบด้วยโครงสร้างที่เป็นวงอะโรมาติก และมีหมู่แทนที่เป็นหมู่ไฮดรอกซี อย่างน้อย 1 หมู่ ในที่นี้จะกล่าวถึงสารกลุ่มที่สำคัญ ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ (โอภา วัชระคุปต์ และคณะ, 2550)

2.10 ฟลาโวนอยด์ (flavonoids)

ฟลาโวนอยด์เป็นสารประกอบฟีโนลิกที่พบมากที่สุด ซึ่งพบได้ทั่วไปในอาหารโดยเฉพาะอย่างยิ่งในพืช เช่น ผัก และผลไม้ ฟลาโวนอยด์เป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างหลักฟลาโวนตรงนิวเคลียส มีสูตรโมเลกุล คือ C15 (C6-C3-C6) โดยมีวงแหวน A และ B (phenyl ring) จับกับไพแรนหรือไพโรน (C) การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างที่ ring C ทำ ให้มีการแยกฟลาโวนอยด์ออกเป็นกลุ่มต่างๆ และกาเกิด hydroxylation ที่ ring A และ B ทำ ให้เกิดอนุพันธ์ของฟลาโวนอยด์ชนิดนั้นๆ (Pietta, 2000; ลือชัย บุตคุป, 2011) ในธรรมชาติพบฟลาโวนอยด์มากกว่า 4,000 ชนิด ส่วนใหญ่อยู่ในรูปกลัยโคไซด์ ซึ่งมีหมู่ไฮดรอกซิลหนึ่งหมู่หรือมากกว่าในโมเลกุลจะจับอยู่กับน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น กลูโคสแรมโนสอะราบิโนส และไซโลส ฟลาโวนอยด์สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่

1) แอนโธไซยานินส์(anthocyanins) ซึ่งจะพบในรูปของอนุพันธ์ต่างๆ พบมากในสีของดอกไม้ผัก และผลไม้

2) แอนโธแซนทินส์(anthoxanthins) เป็นกลุ่มสารที่ไม่มีสีประกอบด้วยกลุ่มต่างๆ ได้แก่ กลุ่มฟลาโวนส์ฟลาแวนส์ไอโซฟลาโวนส์ฟลาโวนอลส์ฟลาวานอลส์และอนุพันธ์ที่อยู่ในรูปไกลโคไซด์ ชนิดของฟลาโวนอยด์ที่พบส่วนใหญ่ คือไมริเซติน (myricetin) ฟิเซติน (fisetin) เคอซิติน (quercetin) และเคมเฟอรอล (kaempferol)

คาทีชิน (catechin) เป็นสารฟลาโวนอยด์กลุ่ม ฟลาวานอลส์ที่พบมากในชาเขียวซึ่งมี 4 ชนิด ได้แก่ epicatechin (EC), (-)-epicatechin-3-gallate (ECG), (-)-epigallcatechin-3-gallate (EGCG) 17 สาร EGCG เป็นสารที่พบในปริมาณมากที่สุดในชาเขียวคือประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ของสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ส่วนชาดำนั้น หลังจากผ่านกระบวนการหมักแล้วสารจำพวกคาทีชินส์

บางส่วนจะถูกเปลี่ยนเป็น flavin และ thearubigins ซึ่งเป็นสารโพลีเมอร์ของสารฟีนอลิค แต่ก็ยังคงมีคุณสมบัติของการเป็นฟีนอลิคอยู่ในน้ำชาที่ได้จากใบชาดำ จึงมักประกอบด้วย catechins 3-10 เปอร์เซ็นต์ theaflavins 3-6 เปอร์เซ็นต์ และ thearubigin 12-18 เปอร์เซ็นต์สารฟีโนลิกเหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการป้องกันสารก่อมะเร็งและต้านการกลายพันธุ์ (antimutagenic) (ลือชัย บุตคุป, 2011)

2.11 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากรายงานก่อนหน้านี้ของ เยาวลักษณ์ บานเพียน, 2008 ศึกษาประสิมธิภาพของเคอร์คูมินิยด์ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *Staphylococcus aureus* Antimicrobial Activity of Curcuminoids Against *Staphylococus aureus* พบว่า การทดสอบประสิทธิภาพของเคอร์คูมินอยด์ในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* จำนวน 45 isolates ซึ่งประกอบด้วย *S. aureus* ซึ่งประกอบด้วย *S. aureus* สายพันธุ์ที่ดื้อยา Methicillin (Methicillin-resistant *S. aureus* ; MRSA) จำนวน 25 isolates ด้วยวิธี Agar dilution พบว่าเคอร์คูมินอยด์สามารถยับยั้งการเจริญของ MRSA และ MSSA ได้โดยมีค่า MIC_{90} เท่ากัน คือ 62.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของเคอร์คูมินอยด์รวมกับยาปฏิชีวนะ พบว่าฤทธิ์รวมระหว่างเคอร์คูมินอยด์กับยา Tetracycline เมื่อทดสอบกับ MRSA และ MSSA เป็นแบบไม่แตกต่างกันจากฤทธิ์เดิม (Indifference) ส่วนฤทธิ์รวมระหว่างเคอร์คูมินอยด์กับยา Gentamicin เมื่อทดสอบกับ MRSA เป็นแบบ Indifference แต่เมื่อทดสอบกับ MSSA มีฤทธิ์แบบเสริมกัน (Synergism) แสดงว่าเคอร์คูมินอยด์ที่ระดับความเข้มข้น 62.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของ MRSA และ MSSA ได้และสามารถเสริมฤทธิ์กับยา Gentamicin ในการยับยั้งการเจริญของ MSSA บางสายพันธุ์

จากรายงานของ Wei et al (2011) รายงานว่าสารสกัดกระสังความเข้มข้นขั้นต่ำ 31.25 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถยั้บยั้งเชื้อ *Edwardsiella tarda, Escherichia coli, Flavobacterium* sp., *Pseudomonas aeruginosa* และ *Vibrio cholerae* และความเข้มข้นขั้นต่ำ 62.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถยั้บยั้งเชื้อ *Klebsiella* sp. *Aeromonas hydrophila* และ *Vibrio alginolyticus* และความเข้มข้นขั้นต่ำ 125 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถยั้บยั้ง *Salmonella* sp. และ *Vibrio parahaemolyticus* ได้ และรายงานของ Idris, Olatunji, & Madufor, (2016) สารสกัดจากกระสังที่สกัดด้วยตัวทำละลายสามารยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* ATCC 35218, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 34089, *Salmonella typhi* ATCC 22648, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Pseudomonas aeruginosa* ได้ และผลการตรวจหารสารพฤกษเคมีของพืชชนิดนี้พบ antraquinone, tannins, flavonoids, alkaloids และ glycosides และสารสกัดมีฤทธิ์ต้านจุลชีพความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์รุนแรงที่สุดโดยมีโซนยับยั้ง 10-12 มิลลิเมตร

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Palakawong et al (2010) สารสกัดของเปลือกผลมังคุดที่สามารถยั้บยั้งแบคทีเรียแกรมบวก (*L. monocytogenes* และ *S. aureus*) และแบคทีเรียแกรมลบ (*E. coli* and *Salmonella* sp.) ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกอยู่ในช่วง 0.025-0.78 มิลลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) อยู่ระหว่าง 0.05-0.39 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่รายงานก่อนหน้านี้ของ Janardhan, Mahendra, Girija, Mahendra, & Priyadharsini, (2017) ศึกษาการยั้บยั้งแบคทีเรียของสารสกัดมังคุดด้วยวิธี well diffusion method พบว่า ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. oralis* (11.3 มิลลิเมตร) *S. mutans* (10.6 มิลลิเมตร) และ *S. salivarius* (3 มิลลิเมตร) ตามลำดับ และรางานก่อนหน้านี้ของ Cunha et al., (2014) ทำการวิเคราะห์ผลเปลือกมังคุดพบ ipids, starch, lignin และ phenolic compounds พบฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ *S. aureus* และ *Escherichia coli* ด้วย MIC ที่ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

จากรายงานของ Biswas et al., (2013) ศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดจากใบฝรั่งโดยใช้ methanol, hexane และ ethyl acetate เป็นตัวทำละลาย พบว่าน้ำมันหอมระเหยในสารสกัดจากใบฝรั่งสามารถยั้บยั้ง *S. aureus*, *Salmonella* spp. และ *Escherichia coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดอาการท้องร่วงสรุปได้ว่าสารสกัดจากใบฝรั่งมีน้ำมันหอมระเหยมีฤทธิ์รุนแรงต่อ *S. aureus* ซึ่งเป็นแหล่งที่สำคัญของสารต้านจุลชีพชนิดใหม่ และรายงานก่อนหน้านี้ของ Farhana et al., (2017) พบว่าสารสกัดจากใบฝรั่งสามารถยับยั้ง *S. aureus* (ATCC 25923), *E. coli* (ATCC 25922), *Bacillus cereus* (BTCC 19), *Shigella sonnei* (BTCC) และ *Salmonella Typhi* (BTCC 197 ได้

จากกการศึกษาก่อนหน้านี้ของ จรัสรัตน์ ปานโคก (2555) ประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอสิระของสารสกัดพืชสมุนไพรไทยบางชนิด ซึ่งงานวิจัยนี้ศึกษาฤทธิ์การต้านอนมุลูอิสระ และปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ทั้งหมดของสารสกัดจากพืช 7 ชนิด ได้แก่ ขิงแก่ ขมิ้นชัน มะขามป้อม ชาอัสสัม ข้าวกล้องหอมนิล และข้าวเหนียวดำ โดยใช้พืชชิ้นส่วนของพืชทั้งสดและแห้ง สกัดด้วยเมทานอล พบว่า สารสกัดจากมะขามป้อมแห้ง มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH และ ABTS สูงที่สุด เท่ากับ 4,191.88 และ 1,744.7 mg/L BHT equivalent/g DW ตามลำดับ และปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด พบว่า สารสกัดจากมะขามป้อมแห้ง มีสารประกอบฟีนอลิกรวมสูงสุด เท่ากับ 260.20 mg GAE/g DW

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ของ ทศพล พลคำมาก และคณะ (2559) ศึกษาการเพิ่มฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำพลูคาวด้วยการผสมกับกระชายดำและหมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก พบว่า ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ของน้ำหมักพลูคาวที่ไม่มีการเติมกระชายดำแต่มีการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก และมีการเติมน้ำอ้อยลงไป มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP เท่ากับ 271.57 μmol/L ซึ่งเพิ่มมากขึ้นกว่า 3.5 เท่าของน้ำหมักพลูคาวที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อและน้ำอ้อย

และเมื่อน้ำหมักพลูคาวด้วยการผสมกับกระชายดำหมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกและเติมน้ำอ้อย พบว่า ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP เท่ากับ 891.0 μmol/L ซึ่งพบว่าสูงกว่า 78.71 μmol/L ที่ได้จากการหมักที่ใช้น้ำหมักพลูคาวเพียงอย่างเดียว จะเห็นว่ากระชายดำมีผลโดยตรงต่อการเพิ่มฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ของน้ำหมักพลูคาว แต่ไม่มีผลเพิ่มปริมาณของกรดแลคติกและกรดอะซิติก ยิ่งไปกว่านั้นพบว่าปริมาณของกรดอินทรีย์จากแบคทีเรียกรดแลคติกที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักมีผลเสริมให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้น

มีการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Chaiyasut et al (2011) ทำการศึกษาสมุนไพรไทย 5 ชนิด ได้แก่ พลูคาว มะขามป้อม ลูกยอ สมอไทย และ กระชายดำ หมักรวมกันโดยใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก พบว่า มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้นเท่ากับ 31.31 mg GAE/mL

การศึกษาก่อนหน้านี้ของ Sawangwan et al (2021) ทำการศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระจากการหมักรำข้าวโดยแบคทีเรียกรดแลคติก พบว่า สารสกัดรำข้าวที่มีการหมักแบบสถานะของแข็ง (SSF) ของแบคทีเรียแลคติก LAB ทั้งสองสายพันธุ์มีปริมาณฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดรำข้าวที่ไม่มีการหมักแบบของแข็ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารสกัดข้าวบาห์นหน้าที่มีความชื้น 50 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร (%w/v)โดย *L. plantarum* ที่ 48 ชั่วโมง แสดงค่าสารประกอบฟีนอลิกสูงสุด (2.85 ± 0.05 มก./มล.) เช่นเดียวกับเปอร์เซ็นต์ที่ดีที่สุดของสารต้านอนุมูลอิสระที่พบในสารสกัดรำข้าวหมักที่มีความชื้น 50 เปอร์เซ็นต์ โดย *L. casei* ที่ระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง (ดอกมะลิไทย = 78.79% และข้าวบ้านหน้า = 78.49%)

จากรายงานของ Abdelwahab et al (2011) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบในกระเพาะอาหารของสารสกัดกระชายขาวด้วยเมทานอลและ phytoconstituent pinostrobin พบว่า สารสกัดกระชายขาวด้วยเมทานอลและ phytoconstituent pinostrobin มีผลต่อการยับยั้งการเกิดเยื่อบุทางเดินอาหาร (cytoprotective) ในหนูที่เกิดจากแผลในกระเพาะอาหาร สารสกัดจากพืชนี้ช่วยลดอาการบวมน้ำใต้เยื่อเมือกและการแทรกซึมของเม็ดเลือดขาวอย่างมีนัยสำคัญ

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

งานวิจัยนี้ศึกษาฤทธิ์ของกระชายขาวที่หมักด้วยแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ MRSA เพื่อช่วยเสริมฤทธิ์การต้านการเจริญเชื้อ Meticillin- *resistance Staphylococcus aureus* (MRSA) รวมถึงศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ และวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (total fhenolic and flavonoid contents) ซึ่งมีขั้นตอนการดำเนินงานวิจัยแบ่งออกเป็น 5 ส่วน ดังต่อไปนี้

3.1 อาหาร สารเคมี วัสดุอุปกรณ์ และเครื่องมือในการทำวิจัย

3.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

3.3 แผนการดำเนินงานวิจัย

3.4 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

3.5 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

3.1 อาหาร สารเคมี วัสดุอุปกรณ์ และเครื่องมือในการทำวิจัย

ตารางที่ 2 อาหาร สารเคมี วัสดุอุปกรณ์ และเครื่องมือในการทำวิจัย

ลำดับที่	รายการ อาหาร และ สารเคมี	รุ่น / บริษัทผู้ผลิต / ประเทศ
1	De Man, Rogosa and Sharpe (MRS)	Himedia / India
2	กลูโคส (C6H12O6)	Fluka / USA
3	เมทานอล (CH3OH)	BDH (Poole, UK)
4	เอทานอล (C2H5OH)	Fluka Chemical Co.
5	2,2-ไดฟีนิล-1-ฟีคิลไฮดราซิลไฮเดรต (DPPH)	Fluka Chemical Co.
6	โทรล็อกซ์ (Trolox)	Fluka Chemical Co.
7	เฟอรัส ซัลเฟต (FeSO4 .7H2O)	Ajax Finechem Pty Ltd,
8	เฟอริกคลอไรด์ (FeCl3 .6H2O)	BDH (Poole, UK)
9	ขวดเก็บตัวอย่าง (Duran Bottle)	Duran made / Germany
10	หลอดทดลอง (Tube)	Pyrex / USA
11	บีกเกอร์ (Beaker)	Pyrex / USA

ตารางที่ 2 อาหาร สารเคมี วัสดุอุปกรณ์ และเครื่องมือในการทำวิจัย (ต่อ)

ลำดับที่	รายการวัสดุและเครื่องมือ	รุ่น / บริษัทผู้ผลิต / ประเทศ
1	ไมโครปิเปต (Micropipette)	Finnpipette F1 / Thermo scientific / Finland
2	ทิป (Tip)	Finn / Thermo scientific / Finland
3	เข็มเขี่ย (Needle)	Finn / Thermo scientific / Finland
4	ลูป (Loop)	Finn / Thermo scientific / Finland
5	จานเพาะเลี้ยง (Petri Plates)	Finn / Thermo scientific / Finland
6	ฟลาสก์ (Flask)	Pyrex / USA
7	หลอดไมโครเซ็นติฟิว (eppendorf)	Finn / Thermo scientific / Finland
8	Vivaspin 10 kDa MWCO membrane ultrafiltration	Sartorius; Göttingen, Germany
9	ตู้เก็บตัวอย่าง (-20 องศาเซลเซียส)	Panasonic / Thailand
10	เพลต 96 หลุม (96 well plate)	Cole-parmer / USA
11	เครื่องวัดพีเอช (pH meter)	Mettler Toledo FiveEASY^{TM}Plus / FEP20
12	ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar air flow)	ยูเนี่ยน ซายน์ เทดดิ้งจำกัด
13	เครื่องนึ่งความดันไอ (Autoclaves)	เวิลด์ไวด์ เทรด ไทย จำกัด
14	ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)	Binder / Germany
15	เครื่องบ่มเขย่า (Shaking Incubators)	LSI-1005R / LabTech / Korea
16	เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)	Universal 320R / Germany
17	เครื่องผสมสาร (Vortex mixer)	Products from Scientific Industries / USA
18	เครื่องอ่านถาดไมโครเพลท (Microplate reader)	M965 / mastertech/ Taiwan
19	เครื่องชั่งแบบละเอียด	Presica 25A / Switzerland

3.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

3.2.1 เชื้อแบคทีเรีย

3.2.1.1 เชื้อแบคทีเรียก่อโรค

เชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ดื้อยา ได้แก่

1. เชื้อ Meticillin-methicillin *S. aureus* (MRSA) ST239 SCC mec Type III ที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลอุตรดิตถ์ จังหวัดอุตรดิตถ์

2. เชื้อ Meticillin-methicillin *S. aureus* (MRSA) ST6186 SCC mec Type IV ที่แยกได้จากผู้ป่วยในโรงพยาบาลพุทธชินราช พิษณุโลก

3. เชื้อ Meticillin-methicillin *S. aureus* (MRSA) ATCC 25923

เชื้อทุกชนิดได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร. อนุศักดิ์ เกิดสิน สังกัดคณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสกลนคร เลขที่ 59/7 หมู่ 1 ตำบลเชียงเครือ อำเภอเมืองสกลนคร จังหวัดสกลนคร 47000

3.2.1.2 แบคทีเรียผลิตกรดแลคติก

แบคทีเรียกลุ่มผลิตกรดแลคติก *Lactobacillus* sp. จำนวน 10 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. pentosus* JM085, *L. pentosus* JM0812, *L. pentosus* UM055, *L. pentosus* UM054, *L. pentosus* YM122, *L. lactis* A7, *L. pentosus* VM096, *L. pentosus* DM068, *E. faecalis* YM126 และ *L. pentosus* VM095 โดยแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกทั้ง 10 สายพันธุ์ ถูกแยกจากน้ำนมแม่ ได้รับอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร. ปริยาภรณ์ อิศรานุวัฒน์ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

3.3 แผนการดำเนินงานวิจัย

รูปแบบการวิจัยเป็นการศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากการหมักกระชายขาวโดยแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก (lactic acid bacteria) โดยใช้แบคทีเรียกลุ่มผลิตกรดแลคติก 10 สายพันธุ์ ซึ่งออกแบบการทดลองแบบแฟกทอเรียล (Factorial in CRD by Univariate) ที่มี 2 ปัจจัย คือ สายพันธุ์ของเชื้อ *Lactobacillus* spp. 10 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. pentosus* JM085, *L. pentosus* JM0812, *L. pentosus* UM055, *L. pentosus* UM054, *L. pentosus* YM122, *L. lactis* A7, *L. pentosus* VM096, *L. pentosus* DM068, *E. faecalis* YM126 และ *L. pentosus* VM095 และระยะเวลาในการหมัก ได้แก่ 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

3.4 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

3.4.1 การเตรียมสมุนไพร

ผงกระชายขาวได้จากร้านทองอินทร์เภสัชถนนสมถวิลราษฎร์ ตำบลตลาด อำเภอเมืองมหาสารคาม จังหวัดมหาสารคาม ประเทศไทย เก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิห้องก่อนจะทำการวิเคราะห์ต่อไป

3.4.2 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย

นำแบคทีเรียกลุ่มผลิตกรดแลคติก 10 สายพันธุ์ มาเพาะเลี้ยงเป็นหัวเชื้อเริ่มต้น โดยใช้เชื้อสต็อกแช่แข็ง (-50 องศาเซลเซียส) ต่อเชื้อลงในอาหารเหลว MRS 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงเทียบเท่าค่ามาตรฐาน mcfarland 0.5 โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตร ซึ่งจะได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.08-0.1 ก่อนที่จะถ่ายลงหัวเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ในอาหารเลี้ยงเชื้อผงกระชาย 5 เปอร์เซ็นต์ และน้ำตาลกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ ที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง

3.4.3 การศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและค่าพีเอช

ศึกษาการเจริญของแบคทีเรียและค่าพีเอชระหว่างกระบวนการหมัก เก็บตัวอย่างระหว่างกระบวนการหมักที่ระยะเวลา 0 24 48 และ 72 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์หาปริมาณเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งวิเคราะห์การเจริญของเชื้อด้วยการ spread plate โดยการนำตัวอย่างที่เก็บแต่ละระยะช่วงเวลา 0 24 48 และ 72 ชั่วโมง มาทำการเจือจางลำดับส่วนอยู่ในช่วง 100-10,000,000 เท่า ทำการดูดตัวอย่างที่มีการเจือจางแต่ละเท่ามา 100 ไมโครลิตร ลงในเพลท และทำการ spread plate ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเลี้ยงในอาหารแข็ง *Lactobacillus* MRS รายงานผลการเจริญในหน่วย (Log CFU/mL) นอกจากนี้ยังมีการวัดค่าพีเอชของเชื้อแบคทีเรียแต่ละระยะช่วงเวลา 0 24 48 และ 72 ชั่วโมง บันทึกผลการทดลอง

3.4.4 การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

3.4.4.1 วิธี DPPH

ดัดแปลงจากวิธีการของ Zhang et al. (2016) โดยมีการดัดแปลงเล็กน้อย ปิเปตตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร ลงในเพลต 96 หลุม จากนั้นเติมสาร 2,2′-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical ที่มีความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ ละลายในเมทานอลปริมาตร 180 ไมโครลิตร บ่มที่

อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องอ่านถาดไมโครเพลท โดยค่าที่ได้จะถูกคำนวณค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ DDPH แสดงในหน่วยหน่วยไมโครกรัมโทรล็อกซ์ต่อมิลลิลิตร (µg TE/mL) โดยใช้กราฟมาตรฐานของสารโทรล็อกซ์ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.4.4.2 วิธี FRAP

ดัดแปลงจากวิธีการของ Bakar et al. (2009) โดยมีการดัดแปลงเล็กน้อย เตรียมสารละลาย FRAP (Ferric reducing antioxidant power) reagent โดยผสม acetate buffer (pH 3.6) 300 มิลลิโมลาร์ กับสารละลาย 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-1,3,5-triazine (TPTZ) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และ Ferric chloride solution 20 มิลลิโมลาร์ ให้เข้ากัน เก็บโดยปราศจากแสง จากนั้นทำการปิเปตตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย FRAP ปริมาตร 180 ไมโครลิตรใน ลงในเพลต 96 หลุม ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร microplate reader spectrophotometer คำนวณค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ FRAP ในหน่วย หน่วยไมโครกรัม Fe(II) ต่อมิลลิลิตร (µg Fe(II)/ mL) โดยใช้กราฟมาตรฐานของสาร $FeSO_4$ โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.4.5 การวิเคราะห์ปริมาณฟลาวนอยด์ทั้งหมด (Total flavonoids content

ดำเนินตามวิธี Bakar et al. (2009) โดยมีการดัดแปลงเล็กน้อย โดยปิเปตตัวอย่าง 20 ไมโครลิตรผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 60 ไมโครลิตร ลงในเพลต 96 หลุม จากนั้นเติม สารละลายโซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$) ความเข้มข้น 5 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และเติมอลูมิเนียมคลอไรด์ ($AlCl_3$•6H2O) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งให้เกิดปฏิกิริยา 1 นาที จากนั้นเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องอ่านถาดไมโครเพลท คำนวณหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดจากกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานรูติน (Rutin) และรายงานผลในหน่วยไมโครกรัมรูตินต่อมิลลิลิตร (µg RE/ mL) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.4.6 การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolics content)

ดำเนินตามวิธี Satir et al. (2015) โดยมีการดัดแปลงเล็กน้อย ปิเปตตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร ลงในเพลต 96 หลุม ผสมกับสารละลายโฟลิน–ไซโอแคลทู (Folin Ci-ocalteu)

ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ 1 นาที จากนั้นเติมโซเดียมไบคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) ความเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30นาที หลังจากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตรโดยใช้เครื่องอ่านถาดไมโครเพลท คำนวณหาปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดจากกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก (Gallic acid) และรายงานผลในหน่วยไมโครกรัมกรดแกลลิกต่อมิลลิลิตร (µg GAE/ mL) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.4.7 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย MRSA โดยการหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ด้วยวิธี Broth microdilution ของน้ำหมักกระชายขาวร่วมกับแบคทีเรียกรดแลกติก

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี MIC โดยวิธี microdilution method ดัดแปลงเล็กน้อยจาก CLSI, 2009 เตรียมเชื้อที่จะนำมาทดสอบโดยเทียบความขุ่นของเชื้อเท่ากับ McFarland No 0.5 จากนั้นเติมลงใน 96 well plate หลุมละ 50 ไมโครลิตร และเตรียมน้ำกระชายขาวหมักเสริมด้วยฤทธิ์ของเชื้อ *L. lactis* A7, *L. pentosus* DM068, *E. faecalis* YM126 และ *L. pentosus* VM095 ซึ่งให้ค่าการวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระสูงสุด นำตัวอย่างน้ำกระชายขาวหมักมาเจือจางลงเป็น 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024 และ 1:2048 มิลลิลิตร ด้วยอาหาร MHB ใน 96 well plate โดยในแถวจะมี 1 หลุมเป็น control โดยจะไม่เติมสารสกัดลงไป ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16–18 ชั่วโมง ลงในแต่ละหลุมปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง การอ่านผลการทดลองค่า MIC ให้สังเกตความขุ่นหรือใสของอาหารที่ไม่มีเชื้อเจริญเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่มีแต่อาหารกับสารสกัด ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัดที่ไม่มีการเจริญของเชื้อให้บันทึกผลการทดลองเป็นค่า MIC ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ (โดยเลือกค่า MIC ที่เหมือนกันอย่างน้อย 2 ซ้ำ)

3.4.8 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย MRSA โดยการหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ด้วยวิธี Broth microdilution ของน้ำหมักกระชายขาวร่วมกับแบคทีเรียกรดแลกติกที่ทำแห้ง ด้วยวิธี Freeze Drying

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี MIC โดยวิธี microdilution method ดัดแปลงเล็กน้อยจาก CLSI, 2009 เตรียมเชื้อที่จะนำมาทดสอบโดยเทียบความขุ่นของเชื้อเท่ากับ McFarland No 0.5 จากนั้นเติมลงใน 96 well plate หลุมละ 50 ไมโครลิตร และเตรียมน้ำกระชายขาวหมักเสริมด้วยฤทธิ์ของเชื้อ *L. lactis* A7, *L. pentosus* DM068, *E. faecalis* YM126 และ *L.*

pentosus VM095 ซึ่งให้ค่าการวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระสูงสุด ที่เวลา 72 ชั่วโมง นำตัวอย่างน้ำหมักไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 10000 rpm เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำส่วนใสไปแช่แข็ง (-50 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำไป Freeze Dry โดยใช้เวลา 4–5 วัน นำผงที่ได้มาคืนรูปให้ได้ความเข้มข้นระดับ 20 มิลลิกรัมมิลลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสมาทำให้ปราศจากเชื้อ โดยกรองผ่าน filter membrane ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2 ไมโครเมตร นำมาเจือจางลงที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10 มิลลิกรัมมิลลิตร และเจือจางลงเป็น 1, 0.1, 0.01, 0.001 มิลลิกรัมมิลลิตร ด้วยอาหาร MHB ใน 96 well plate หลุมละ 50 ไมโครลิตร โดยใช้สารกัดและ MHB เป็น negative control และใช้เชื้อร่วมกับ MHB เป็น positive control ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16–18 ชั่วโมง การอ่านผลการทดลองค่า MIC ให้สังเกตความขุ่นหรือใสของอาหารที่ไม่มีเชื้อเจริญเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่มีแต่อาหารกับสารสกัด ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัดที่ไม่มีการเจริญของเชื้อให้บันทึกผลการทดลองเป็นค่า MIC ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ (โดยเลือกค่า MIC ที่เหมือนกันอย่างน้อย 2 ซ้ำ)

3.4.9 การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย MRSA โดยการหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ด้วยวิธี Broth microdilution ของน้ำหมักกระชายขาวร่วมกับแบคทีเรียกรดแลกติก ที่ทำแห้ง ด้วยวิธีอบแห้งด้วยตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี MIC โดยวิธี microdilution method ดัดแปลงเล็กน้อยจาก CLSI, 2009 เตรียมเชื้อที่จะนำมาทดสอบโดยเทียบความขุ่นของเชื้อเท่ากับ McFarland No 0.5 จากนั้นเติมลงใน 96 well plate หลุมละ 50 ไมโครลิตร และเตรียมน้ำกระชายขาวหมักเสริมด้วยฤทธิ์ของเชื้อ *L. lactis* A7, *L. pentosus* DM068, *E. faecalis* YM126 และ *L. pentosus* VM095 ซึ่งให้ค่าการวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระสูงสุด ที่เวลา 72 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 10000 rpm เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำส่วนใสไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำผงที่ได้มาคืนรูปให้ได้ความเข้มข้นระดับ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 10000 rpm เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสมาทำให้ปราศจากเชื้อ โดยกรองผ่าน filter membrane ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2 ไมโครเมตร นำมาเจือจางลงที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร และเจือจางลงเป็น 1, 0.1, 0.01, 0.001 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ด้วยอาหาร MHB ใน 96 well plate หลุมละ 50 ไมโครลิตร โดยใช้สารกัดและ MHB เป็น negative control และใช้เชื้อร่วมกับ MHB เป็น positive control ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16–18 ชั่วโมง การอ่านผลการทดลองค่า MIC ให้สังเกตความขุ่นหรือใสของอาหารที่ไม่มีเชื้อเจริญเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่มีแต่อาหารกับสารสกัด ความ

เข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัดที่ไม่มีการเจริญของเชื้อให้บันทึกผลการทดลองเป็นค่า MIC ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ (โดยเลือกค่า MIC ที่เหมือนกันอย่างน้อย 2 ซ้ำ)

3.5 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

3.5.1 สถิติพื้นฐาน ได้แก่ เปอร์เซ็นต์ ค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.5.2 การวิเคราะห์หาข้อมูลเพื่อทดสอบสมมติฐาน โดยใช้โปรแกรม SPSS Version 20 สถิติที่ใช้ คือ การวิเคราะห์ความแปรปรวนสำหรับการทดลองแฟกทอเรียล (Factorial in CRD by Univariate) ที่มี 2 ปัจจัย และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยตามวิธีของ Duncan Multiple's Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

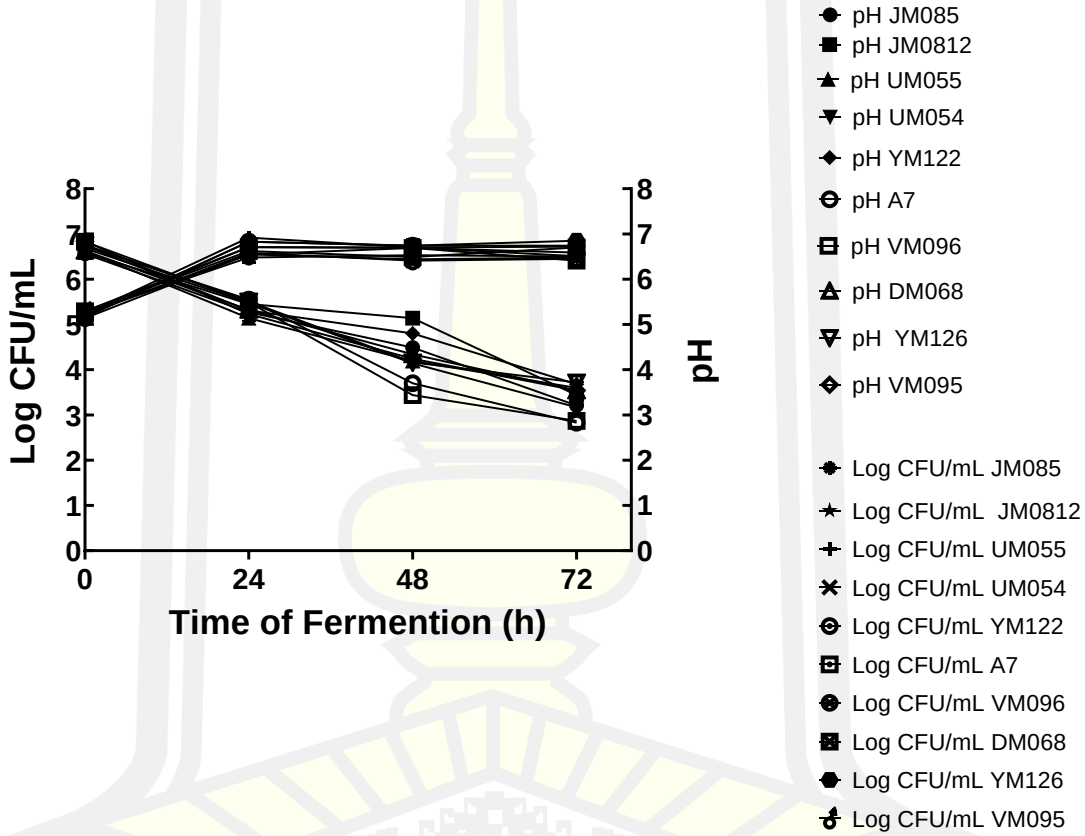
บทที่ 4
ผลและอภิปรายผลการทดลอง

4.1 การศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกและค่าพีเอชต่อการหมักกระชายขาว

การศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกและค่าพีเอชต่อการหมักกระชายขาว โดยใช้เชื้อ Lactobacillus spp. 8 สายพันธุ์ Lactococcus sp. 1 สายพันธุ์ และ Enterococcus sp. 1 สายพันธุ์ได้แก่ *L. pentosus* JM085, *L. pentosus* JM0812, *L. pentosus* UM055, *L. pentosus* UM054, *L. pentosus* YM122, *L. lactis* A7, *L. pentosus* VM096, *L. pentosus* DM068, *E. faecalis* YM126 ผลการทดลอง พบว่า ที่ระยะเวลา 0 ชั่วโมง เชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกทั้งหมด 10 สายพันธุ์ มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ log 5 CFU/mL เมื่อระยะเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง มีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นที่ log 6 CFU/mL และเมื่อระยะเวลา 48 ชั่วโมง และ 72 ชั่วโมง ปริมาณเชื้อมีการเจริญเริ่มคงที่ โดยปริมาณเชื้อจะเท่ากับ log 6.9 CFU/mL ในขณะที่ค่าพีเอชลดลงเรื่อยๆ ตามระยะเวลาในการหมัก (ภาพที่1) จะเห็นว่าค่าพีเอชเริ่มต้นของเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกทั้งหมด 10 สายพันธุ์ ที่พีเอช 6.5 และเมื่อระยะเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง พบว่าค่าพีเอชลดลงเหลือ 5.3 และเมื่อระยะเวลาใรการหมักเพิ่มขึ้นค่าพีเอชจะลงลงเรื่อยๆ จนกระทั่งที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าค่าพีเอชลดลงเหลือ 2.8 ดังนั้นจะเห็นว่าเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้นการเจริญของเชื้อจะเพิ่มขึ้นและจะคงที่หรือลดลงตามแหล่งคาร์บอนที่แบคทีเรียใช้ในการเมทาบอลิซึมเพื่อให้เกิดพลังงานและนำไปใช้ในการเจริญ เมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้นแหล่งคาร์บอนที่แบคทีเรียใช้ในการเผาผลาญให้เกิดพลังงานจะลดลงเรื่อยๆ แสดงว่าการใช้แหล่งคาร์บอนเพื่อให้เกิดพลังงานงานของแบคทีเรียด้วย การหมักจะทำให้เกิดกรดขึ้นระหว่างกระบวนการหมักส่งผลให้ค่าพีเอชลดลงเรื่อยๆ การลดลงของค่าพีเอชเกิดจากกระบวนการหมักของแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกแบบ Homofermentative LAB ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการหมักแบบ Homofermentative จะทำให้เกิดกรดแลคติกและค่าพีเอชก็จะลดลงอีกด้วย ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ของ ณฐพงศ์ เมธินธรังสรรค์ และดวงเดือน วัฏฏานุรักษ์ (2558) ศึกษาการผลิตน้ำหมักชีวภาพเสริมโพรไบโอติกจากเห็ดหอม พบว่า การเจริญของเชื้อแบคทีเรีย Lactobacillus casei เพิ่มขึ้น ซึ่งเกิดจากการใช้น้ำตาลของเชื้อแบคทีเรีย ทำให้ปริมาณน้ำตาลในน้ำหมักลดลง และค่าพีเอชลดลงอีกด้วย

จากรายงานก่อนหน้านี้ของ Palachum et al. (2017) ศึกษาศักยภาพโปรไบโอติกในหลอดทดลองของ L. plantarum WU-P19 ที่แยกได้จากสมุนไพรหมักแบบดั้งเดิม พบว่า จำนวนจุลินทรีย์ในตัวอย่างสมุนไพรหมักอยู่ในช่วง 7.43 ± 0.02 ถึง 8.21 ± 0.01 log CFU/mLในมีรายงานก่อนหน้านี้ของ Kyung et al. (2004) ศึกษาความเหมาะสมของน้ำมะเขือเทศเพื่อนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการ

ผลิตน้ำมะเขือเทศเสริมโพรไบโอติก โดยใช้แบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. plantarum* C3, *L. acidophilus* LA3, *L. delbrueckii* D7, และ *L. casei* A4 พบว่า การเจริญของเชื้อแบคทีเรียเพิ่มขึ้น น้ำหมักมีค่าพีเอชเป็นกรดทั้งหมด โดยที่ค่าพีเอชลดลงที่ 4.1 และปริมาณความเป็นกรดเท่ากับ 0.65 เปอร์เซ็นต์ และในทำนองเดียวกัน มีรายงานของ Nguyen et al (2013) พบว่าจุลินทรีย์หมักในผักดองเวียดนาม (มัสตาร์ด หัวบีท มะเขือยาว) จำนวนรายงานปริมาณเชื้อแบคทีเรียอยู่ในช่วง 10^8 ถึง 10^9 CFU/g ในทำนองเดียวกันในผักดองของเทือกเขาหิมาลัยตะวันออก (กุนดรุก ซิงกิ และไคปี) จำนวนจุลินทรีย์อยู่ในช่วงจาก 10^7 ถึง 10^8 CFU/กรัม (Tamang et al. 2005)



รูปภาพที่ 3 การเจริญของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด 10 สายพันธุ์ และค่าพีเอชในการหมัก 72 ชั่วโมง

4.2 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

น้ำกระชายขาวกระชายขาวที่หมักด้วยแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก *Lactobacillus* spp. 8 สายพันธุ์ *Lactococcus* sp. 1 สายพันธุ์ และ *Enterococcus* sp. 1 สายพันธุ์ ซึ่งปัจจัยที่ศึกษา 2 ปัจจัย ได้แก่ สายพันธุ์ของเชื้อ Lactic acid bacteria และระยะเวลาในการหมักที่มีผลต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ผลการทดลอง พบว่า ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และวิธี FRAP เพิ่มขึ้น

อย่างมีนัยสำคัญแสดงดังตารางที่ 1 จะเห็นว่าเมื่อระยะเวลาในการหมักเพิ่มขึ้นจะส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของการยับยั้งกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อเปรียบเทียบสายพันธุ์ของเชื้อ *Lactobacillus* spp. ต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ พบว่า กระชายขาวที่เสริมด้วยฤทธิ์ด้วย *L. pentosus* DM068 ที่ระยะเวลาในการหมัก 72 ชั่วโมง ส่งผลต่อการยับยั้งกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดเท่ากับ 83.42±1.30 ไมโครกรัมโทรล็อกซ์ต่อมิลลิลิตร และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP พบว่า กระชายขาวที่เสริมด้วยฤทธิ์ด้วย *L. pentosus* VM095 ที่ระยะเวลาในการหมัก 72 ชั่วโมง ส่งผลต่กการยับยั้งกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดเท่ากับ 295.82±2.15 ไมโครกรัม Fe(II) ต่อมิลลิลิตร

จากการศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากการหมักกระชายขาวโดยแบคทีเรียกรดแลคติก พบว่า หลังจากการหมักน้ำหมักกระชายขาวด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากในกระบวนการหมักจะทำให้ปริมาณกรดอินทรีย์เพิ่มขึ้นจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักส่งผลให้เสริมฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้น และส่งผลให้มีฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานของ Shori (2013) ศึกษาปริมาณกรดอินทรีย์ในนมวัวหมักที่หมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก พบว่า เมื่อค่าพีเอชลดลง ปริมาณกรดทั้งหมดและกรดอินทรีย์สูงขึ้นจะช่วยเสริมฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้

4.3 ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total flavonoinds content)

น้ำกระชายขาวหมักเสริมด้วยฤทธิ์ของเชื้อ *Lactobacillus* spp. 8 สายพันธุ์ *Lactococcus* sp. 1 สายพันธุ์ และ *Enterococcus* sp. 1 สายพันธุ์ ซึ่งปัจจัยที่ศึกษา 2 ปัจจัย ได้แก่ สายพันธุ์ของเชื้อ Lactic acid bacteria และระยะเวลาในการหมักที่มีผลต่อปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ผลการทดลอง พบว่า ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญแสดงดังตารางที่ 2 เมื่อระยะเวลาในการหมักเพิ่มขึ้นจะส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และพบว่ากระชายขาวที่เสริมด้วยฤทธิ์ด้วยเชื้อ *E. faecalis* YM126 ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง มีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงที่สุดเท่ากับ 226.43±14.29 ไมโครกรัมรูตินต่อมิลลิลิตร

4.4 ปริมาณฟีโนลิกทั้งหมด (Total phenolics content)

น้ำกระชายขาวหมักเสริมด้วยฤทธิ์ของเชื้อ *Lactobacillus* spp. 8 สายพันธุ์ *Lactococcus* sp. 1 สายพันธุ์ และ *Enterococcus* sp. 1 สายพันธุ์ ซึ่งปัจจัยที่ศึกษา 2 ปัจจัย ได้แก่ สายพันธุ์ของเชื้อ Lactic acid bacteria และระยะเวลาในการหมักที่มีผลต่อปริมาณปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ผลการทดลอง พบว่า ระยะเวลาในการหมักเพิ่มขึ้นจะส่งผลต่อปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเพิ่มขึ้นอย่างมี

นัยสำคัญแสดงดังตารางที่ 3 ในขณะที่สายพันธุ์ของแบคทีเรีย *L. lactis* A7 และสายพันธุ *L. pentosus* DM068 มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุดเท่ากับ 298.85±1.89, 281.83±1.76 ไมโครกรัมกรดแกลลิกต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ของ ทศพล พลคำมาก และคณะ (2559) ศึกษาการเพิ่มฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำพลูคาวด้วยการผสมกับกระชายดำและหมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก พบว่า ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ของน้ำหมักพลูคาวที่ไม่มีการเติมกระชายดำแต่มีการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก และมีการเติมน้ำอ้อยลงไป มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP เท่ากับ 271.57 μmol/L ซึ่งเพิ่มมากขึ้นกว่า 3.5 เท่าของน้ำหมักพลูคาวที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อและน้ำอ้อย และเมื่อน้ำหมักพลูคาวด้วยการผสมกับกระชายดำหมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกและเติมน้ำอ้อย พบว่า ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP เท่ากับ 891.0 μmol/L ซึ่งพบว่าสูงกว่า 78.71 μmol/L ที่ได้จากการหมักที่ใช้น้ำหมักพลูคาวเพียงอย่างเดียว จะเห็นว่ากระชายดำมีผลโดยตรงต่อการเพิ่มฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ของน้ำหมักพลูคาว แต่ไม่มีผลเพิ่มปริมาณของกรดแลคติกและกรดอะซิติก ยิ่งไปกว่านั้นพบว่าปริมาณของกรดอินทรีย์จากแบคทีเรียกรดแลคติกที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักมีผลเสริมให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้น

มีการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Chaiyasut et al (2011) ทำการศึกษาสมุนไพรไทย 5 ชนิด ได้แก่ พลูคาว มะขามป้อม ลูกยอ สมอไทย และ กระชายดำ หมักรวมกันโดยใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก พบว่า มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้นเท่ากับ 31.31 mg GAE/mL

การศึกษาก่อนหน้านี้ของ Sawangwan et al (2021) ทำการศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระจากการหมักรำข้าวโดยแบคทีเรียกรดแลคติก พบว่า สารสกัดรำข้าวที่มีการหมักแบบสถานะของแข็ง (SSF) ของแบคทีเรียแลคติก LAB ทั้งสองสายพันธุ์มีปริมาณฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดรำข้าวที่ไม่มีการหมักแบบของแข็ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารสกัดข้าวบาห์นหน้าที่มีความชื้น 50 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร (%w/v)โดย *L. plantarum* ที่ 48 ชั่วโมง แสดงค่าสารประกอบฟีนอลิกสูงสุด (2.85 ± 0.05 มก./มล.) เช่นเดียวกับเปอร์เซ็นต์ที่ดีที่สุดของสารต้านอนุมูลอิสระที่พบในสารสกัดรำข้าวหมักที่มีความชื้น 50 เปอร์เซ็นต์ โดย *L. casei* ที่ระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง (ดอกมะลิไทย = 78.79% และข้าวบ้านหน้า = 78.49%)

จากรายงานของ Abdelwahab et al (2011) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบในกระเพาะอาหารของสารสกัดกระชายขาวด้วยเมทานอลและ phytoconstituent pinostrobin พบว่า สารสกัดกระชายขาวด้วยเมทานอลและ phytoconstituent pinostrobin มีผลต่อการยับยั้งการเกิดเยื่อบุทางเดินอาหาร (cytoprotective) ในหนูที่เกิดจากแผลในกระเพาะอาหาร สารสกัดจากพืชนี้ช่วยลดอาการบวมน้ำใต้เยื่อเมือกและการแทรกซึมของเม็ดเลือดขาวอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 3 ผลของน้ำหมักกระชายขาวที่หมักด้วยแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก 10 สายพันธุ์ ต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระวิธี DPPH และวิธี FRAP

Microorganisms	DPPH (µg TE/mL)				FRAP (µg Fe(II)/ mL)			
	0 h	24 h	48 h	72 h	0 h	24 h	48 h	72 h
Lactobacillus 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}	220.12±1.42^{d,D}	237.57±3.82^{d,C}	268±0.29^{d,B}	276.33±0.76^{d,A}
Lactobacillus 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}	219.04±4.66^{d,D}	240.86±5.12^{d,C}	266.29±0.52^{d,B}	277.14±0.31^{d,A}
Lactobacillus 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}	224.58±1.63^{cd,D}	232.45±2.73^{c,d,C}	267.02±0.31^{c,d,B}	289.50±0.52^{c,d,A}
Lactobacillus 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}	230.24±5.46^{d,D}	227.76±3.06^{d,C}	263.57±0.44^{d,B}	281.02±0.86^{d,A}
Lactobacillus 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}	235.32±2.49^{d,D}	216.71±5.50^{d,C}	270.24±0.86^{d,B}	284.19±1.30^{d,A}
Lactococcus 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}	229.93±3.14^{d,D}	228.50±8.59^{d,C}	263.88±0.53^{d,B}	277.84±0.65^{d,A}
Lactobacillus 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}	231.33±2.22^{cd,D}	221.29±4.33^{c,d,C}	266.25±0.29^{c,d,B}	289.97±0.60^{c,d,A}
Lactobacillus pentosus DM068	25.62±5.71^{a,D}	57.37±1.17^{a,C}	72.64±2.5^{a,B}	83.42±1.30^{a,A}	225.51±2.44^{c,C}	238.69±5.39^{c,D}	267.49±0.53^{c,B}	284.19±2.56^{c,A}
Enterococcus 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}	235.55±5.51^{b,D}	245.05±2.68^{b,C}	269.27±0.66^{b,B}	284.97±1.23^{b,A}

Lactobacillus 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]	227.49±10.19 a,A	255.51±2.66[a, A]	274.23±0.47[a, A]	295.82±2.15[a, A]

อักษร [A, B, C...] ที่แตกต่างกันหมายถึงในข้อมูลคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิต ($p < 0.05$) และอักษร [a, b, c...] ที่แตกต่างกันหมายถึงในข้อมูลแถวเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยใช้ Factorial in CRD กับ Duncan's Multiple Range Test

ตารางที่ 4 ผลของน้ำหมักกระชายขาวที่หมักด้วยแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก 10 สายพันธุ์ ต่อสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

Microorganisms	TFC (µg RE/ mL)			
	0 h	24 h	48 h	72 h
Lactobacillus pentosus JM085	69.77±7.57^{a,D}	173.43±5.51^{a,C}	190.43±6.35^{a,B}	219.77±7.23^{a,A}
Lactobacillus pentosus JM0812	52.43±5.13^{d,D}	150.10±13.75^{d,C}	155.77±2.08d^{,B}	182.43±3.79^{d,A}
Lactobacillus pentosus UM055	50.77±5.51^{bc,D}	162.43±8.08^{bc,C}	182.77±6.81^{bc,B}	192.77±8.96^{bc,A}
Lactobacillus pentosus UM054	69.10±15.10^{bc,D}	159.43±5.51^{bc,C}	181.43±13.80^{bc,B}	215.10±6.93^{bc,A}
Lactobacillus pentosus YM122	51.43±8.33^{bc,D}	159.77±11.85^{bc,C}	181.10±7.21^{bc,B}	207.10±4.36^{bc,A}
Lactococcus lactis A7	64.43±7.57^{b,D}	167.43±14.53^{b,C}	182.77±6.11^{b,B}	192.43±9.61^{b,A}
Lactobacillus pentosus VM096	50.10±2.65^{cd,D}	164.43±2.31^{cd,C}	170.43±5.86^{cd,B}	174.10±17.58^{cd,A}
Lactobacillus pentosus DM068	49.77±11.06^{d,D}	148.43±23.12^{d,C}	159.43±4.62^{d,B}	188.43±9.24^{d,A}
Enterococcus faecalis YM126	50.43±3.79^{a,D}	174.10±7.00^{a,C}	211.10±4.58^{a,B}	226.43±14.29^{a,A}
Lactobacillus pentosus VM095	57.43±7.51^{bc,D}	169.77±22.23^{bc,C}	174.44±7.37^{bc,B}	196.77±10.97^{bc,A}

อักษร $^{A, B, C...}$ ที่แตกต่างกันหมายถึงในข้อมูลคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิต ($p < 0.05$) และอักษร $^{a, b, c...}$ ที่แตกต่างกันหมายถึงในข้อมูลแถวเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยใช้ Factorial in CRD กับ Duncan's Multiple Range Test

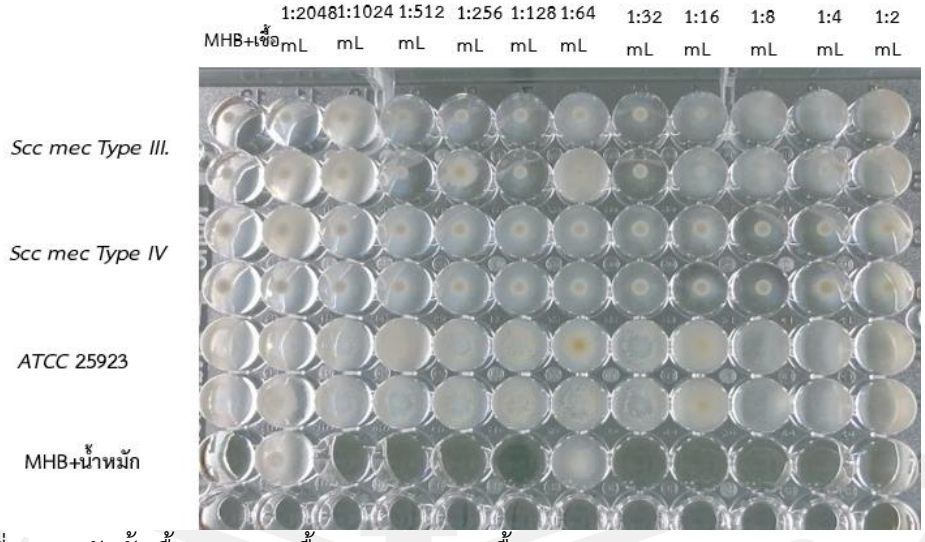
ตารางที่ 5 ผลของน้ำหมักกระชายขาวที่หมักด้วยแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก 10 สายพันธุ์ ต่อสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

Microorganisms	TPC (µg GAE/ mL)			
	0 h	24 h	48 h	72 h
Lactobacillus pentosus JM085	115.88±1.56^{abc,D}	275.99±25.37^{abc,C}	277.18±2.03^{abc,B}	275.52±2.42^{abc,A}
Lactobacillus pentosus JM0812	115.70±3.09^{cde,D}	268.32±14.90^{cde,C}	265.16±1.24^{cde,B}	275.04±6.32^{cde,A}
Lactobacillus pentosus UM055	110.40±7.53^{cde,D}	249.98±11.45^{cde,C}	261.23±8.21^{cde,B}	273.20±7.90^{cde,A}
Lactobacillus pentosus UM054	111.53±3.51^{cde,D}	254.39±8.66^{cde,C}	259.27±1.96^{cde,B}	274.27±0.31^{cde,A}
Lactobacillus pentosus YM122	99.09±24.07^{e,D}	227.90±12.06^{e,C}	236.47±6.60^{e,B}	271.11±10.83^{e,A}
Lactococcus lactis A7	96.11±18.57^{ab,D}	291.35±15.83^{ab,C}	290.93±5.33^{ab,B}	298.85±1.89^{ab,A}
Lactobacillus pentosus VM096	104.86±6.04^{cde,D}	257.18±14.46^{cde,C}	258.20±1.72^{cde,B}	271.71±6.93^{cde,A}
Lactobacillus pentosus DM068	165.82±103.82^{a,D}	276.29±14.38^{a,C}	278.85±10.51^{a,B}	281.83±1.76^{a,A}
Enterococcus faecalis YM126	106.77±22.86^{cde,D}	234.09±16.35^{cde,C}	252.54±0.92^{cde,B}	271.53±4.53^{cde,A}
Lactobacillus pentosus VM095	116.83±12.85^{cde,D}	233.49±16.62^{cde,C}	255.22±5.33^{cde,B}	267.01±1.02^{cde,A}

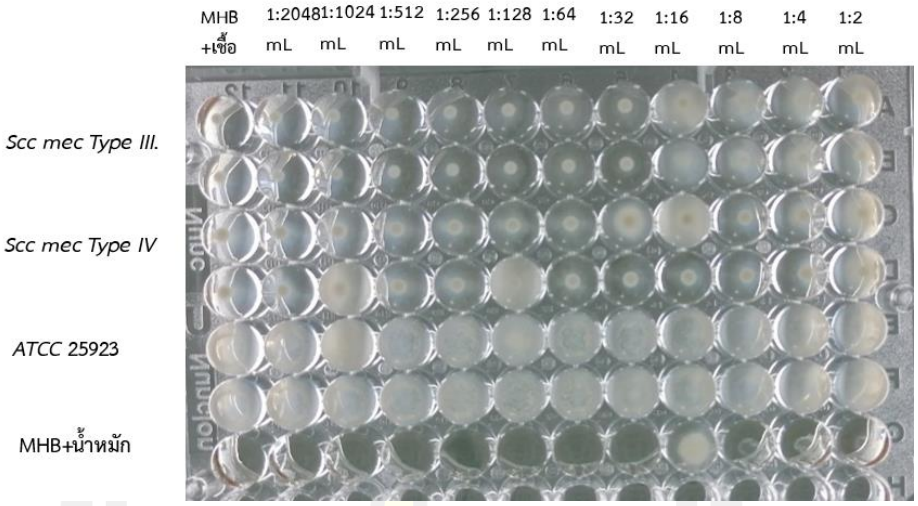
อักษร $^{A, B, C...}$ ที่แตกต่างกันหมายถึงในข้อมูลคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิต ($p < 0.05$) และอักษร $^{a, b, c...}$ ที่แตกต่างกันหมายถึงในข้อมูลแถวเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยใช้ Factorial in CRD กับ Duncan's Multiple Range Test

4.5 การยับยั้งแบคทีเรีย MRSA โดยการหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ด้วยวิธี Broth microdilution

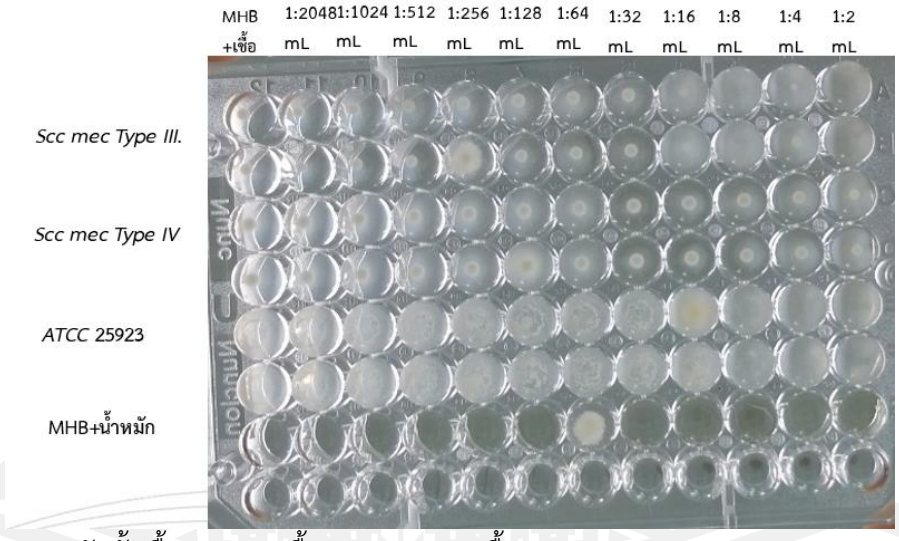
น้ำกระชายขาวหมักเสริมด้วยฤทธิ์ของเชื้อ *Lactobacillus* spp. 8 สายพันธุ์ *Lactococcus* sp. 1 สายพันธุ์ และ *Enterococcus* sp. 1 สายพันธุ์ ซึ่งปัจจัยที่ศึกษา 2 ปัจจัย ได้แก่ สายพันธุ์ของเชื้อ Lactic acid bacteria และระยะเวลาในการหมักที่มีผลต่อการยับยั้งแบคทีเรีย MRSA โดยคัดเลือกน้ำหมักที่มีปริมารสารต้านอนุมูลอิสระและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูงสุดมาทำการทดลอง โดยใช้เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. pentosus* DM068, *E. faecalis* YM126, *L. lactis* A7 และ *L. pentosus* VM095 ซึ่งใช้ความเข้มข้นของน้ำหมัก 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024 และ 1:2048 มิลลลิลิตร ผลการทดลอง พบว่า กระชายขาวที่หมักร่วมกับเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 สายพันธุ์ ไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย MRSA (แสดงดังรูปภาพที่ 4-7) โดยมีเชื้อ mec 3 จาก Uttaradit hospital, เชื้อ mec 4 จาก Buddhachinaraj hospital และ เชื้อ *Staphylococcus aureus* ATcc 25923



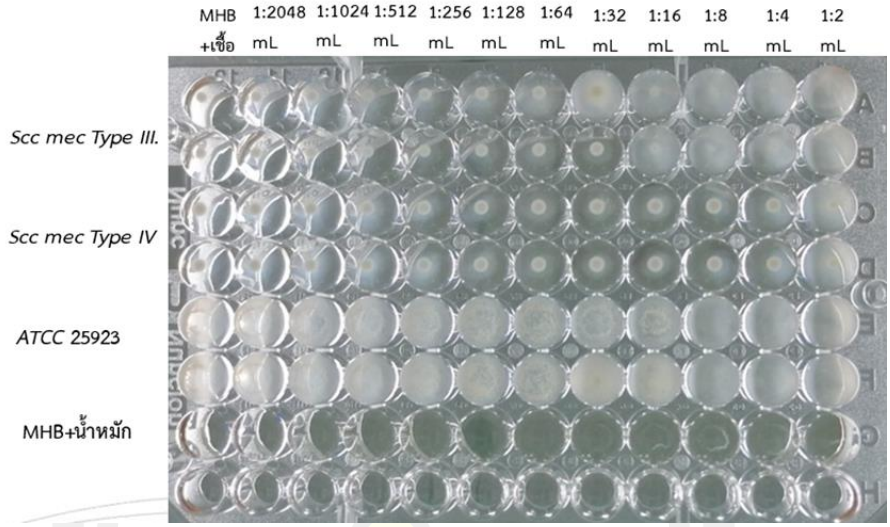
รูปภาพที่ 4 การยับยั้งเชื้อ mec 3 เชื้อ mec 4 และ เชื้อ *S. aureus* ATcc 25923 ของกระชายหมักร่วมกับเชื้อ *L. lactis* A7



รูปภาพที่ 5 การยับยั้งเชื้อ mec 3 เชื้อ mec 4 และเชื้อ *S. aureus* ATcc 25923 ของกระชายหมักร่วมกับเชื้อ *E. faecalis* YM126



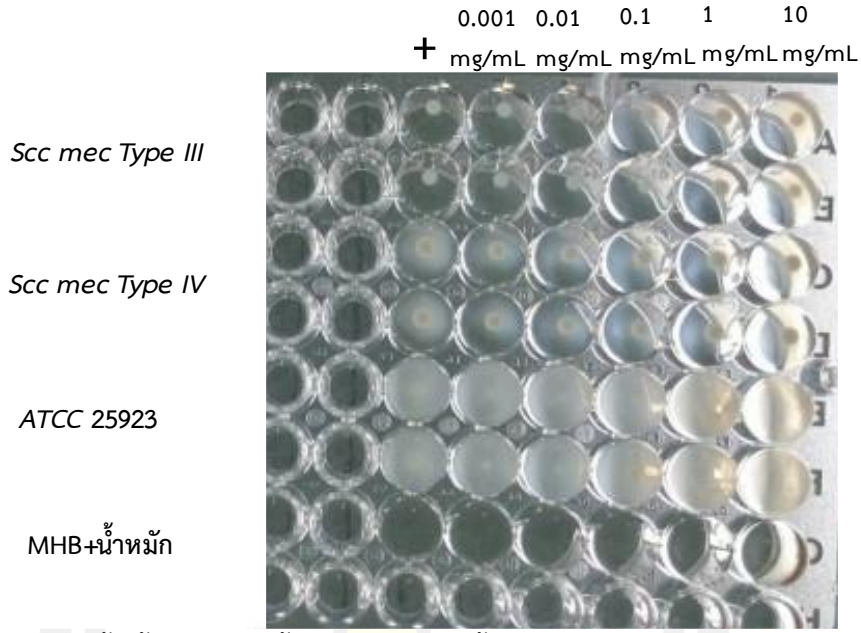
รูปภาพที่ 6 การยับยั้งเชื้อ mec 3 เชื้อ mec 4 และ เชื้อ *S. aureus* ATcc 25923 ของกระชายหมักร่วมกับเชื้อ *L. pentosus* DM068



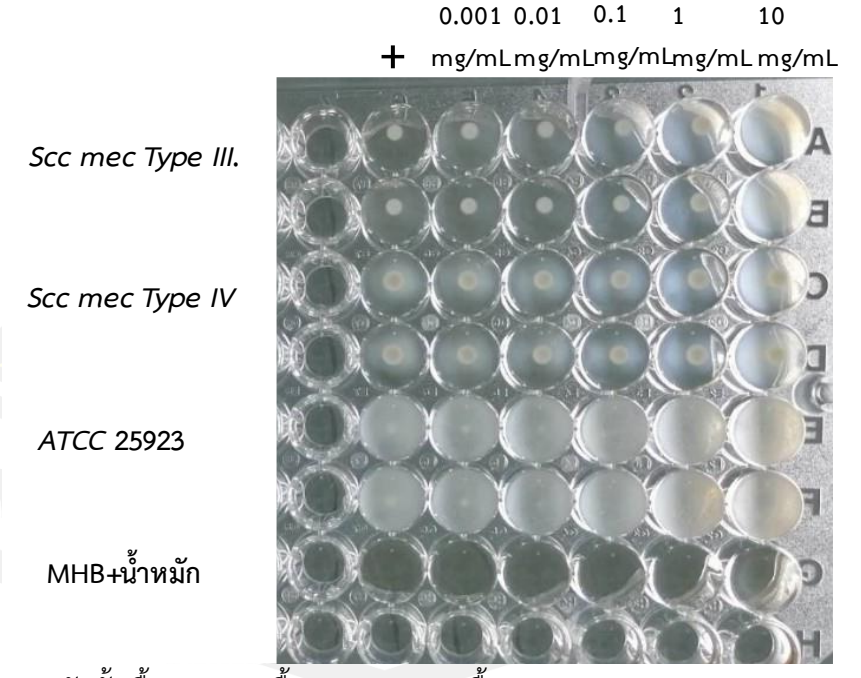
รูปภาพที่ 7 การยับยั้งเชื้อ mec 3 เชื้อ mec 4 และ เชื้อ *S. aureus* ATcc 25923 ของกระชายหมักร่วมกับเชื้อ *L. pentosus* VM095

4.5.1 ผลการยับยั้งแบคทีเรีย MRSA โดยการหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ด้วยวิธี Broth microdilution ของน้ำหมักกระชายขาวร่วมกับแบคทีเรียกรดแลกติกที่ทำแห้ง ด้วยวิธี Freeze

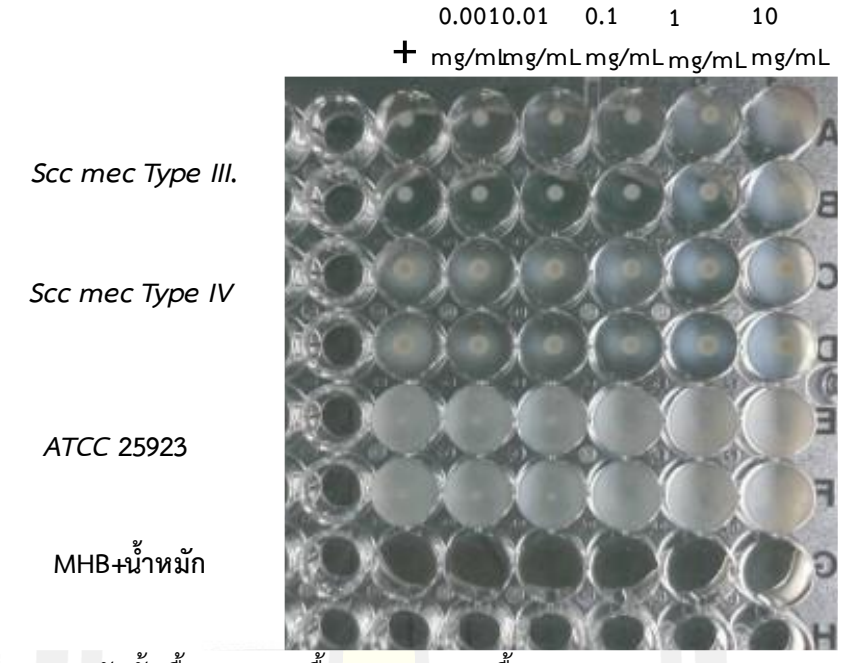
น้ำกระชายขาวหมักเสริมด้วยฤทธิ์ของเชื้อ *Lactobacillus* spp. 8 สายพันธุ์ *Lactococcus* sp. 1 สายพันธุ์ และ *Enterococcus* sp. 1 สายพันธุ์ ซึ่งปัจจัยที่ศึกษา 2 ปัจจัย ได้แก่ สายพันธุ์ของเชื้อ Lactic acid bacteria และระยะเวลาในการหมักที่มีผลต่อการยับยั้งแบคทีเรีย MRSA โดยคัดเลือกน้ำหมักที่มีปริมารสารต้านอนุมูลอิสระและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูงสุดมาทำการทดลองโดยใช้เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. pentosus* DM068, *E. faecalis* YM126, *L. lactis* A7 และ *L. pentosus* VM095 โดยใช้ตัวอย่างที่เป็นผงแห้งด้วยวิธี Freeze Dry เพื่อทดสอบการยับยั้งด้วยความเข้มข้นระดับ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลลิตร นำมาเจือจางลงที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลลิตร และเจือจางลงเป็น 1, 0.1, 0.01, และ 0.001 มิลลิกรัมต่อมิลลลิตร ผลการทดลอง พบว่า น้ำกระชายขาวหมักเสริมด้วยฤทธิ์ของเชื้อ *L. lactis* A7, *L. pentosus* DM068, *E. faecalis* YM126 และ *L. pentosus* VM095 ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรีย MRSA (ภาพที่ 8-11)



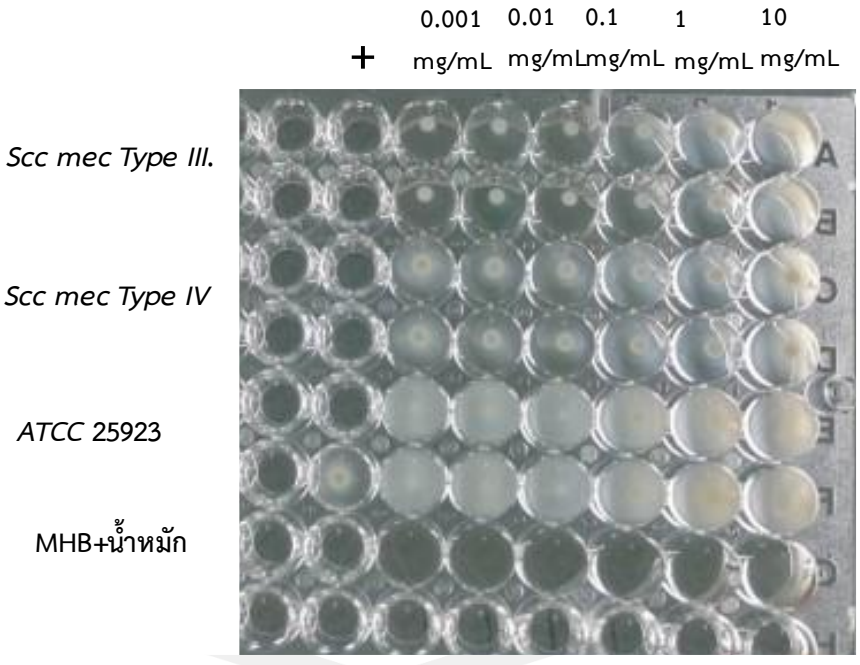
รูปภาพที่ 8 การยับยั้งเชื้อ mec 3 เชื้อ mec 4 และ เชื้อ *S. aureus* ATcc 25923 ของกระชายหมักร่วมกับ เชื้อ *L. lactis* A7 โดยเพิ่มความเข้มข้นด้วยวิธี Freeze Dry



รูปภาพที่ 9 การยับยั้งเชื้อ mec 3 เชื้อ mec 4 และ เชื้อ *S. aureus* ATcc 25923 ของกระชายหมักร่วมกับเชื้อ *E. faecalis* YM126 โดยเพิ่มความเข้มข้นด้วยวิธี Freeze Dry



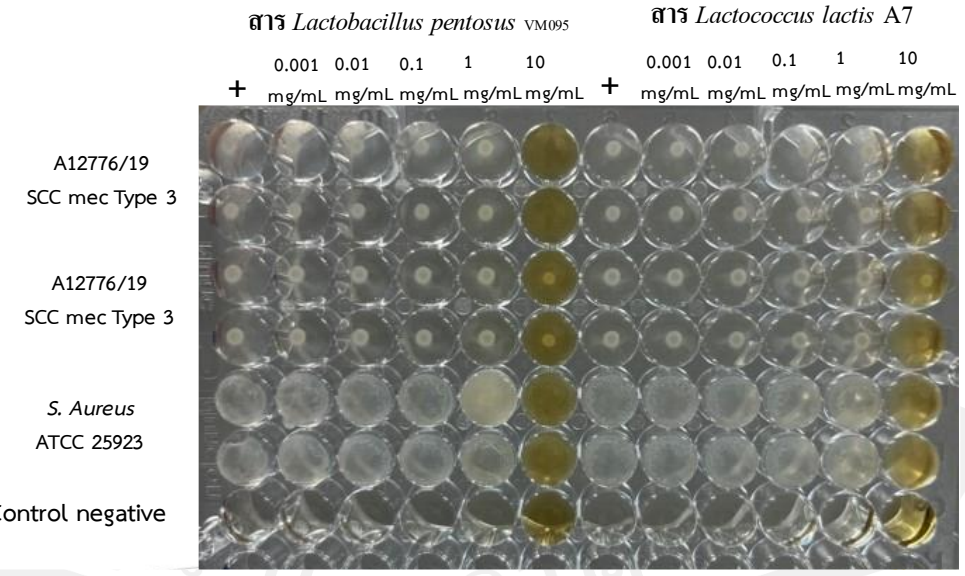
รูปภาพที่ 10 การยับยั้งเชื้อ mec 3 เชื้อ mec 4 และเชื้อ *S. aureus* ATcc 25923 ของกระชายหมักร่วมกับเชื้อ *L. pentosus* DM068 โดยเพิ่มความเข้มข้น ด้วยวิธี Freeze Dry



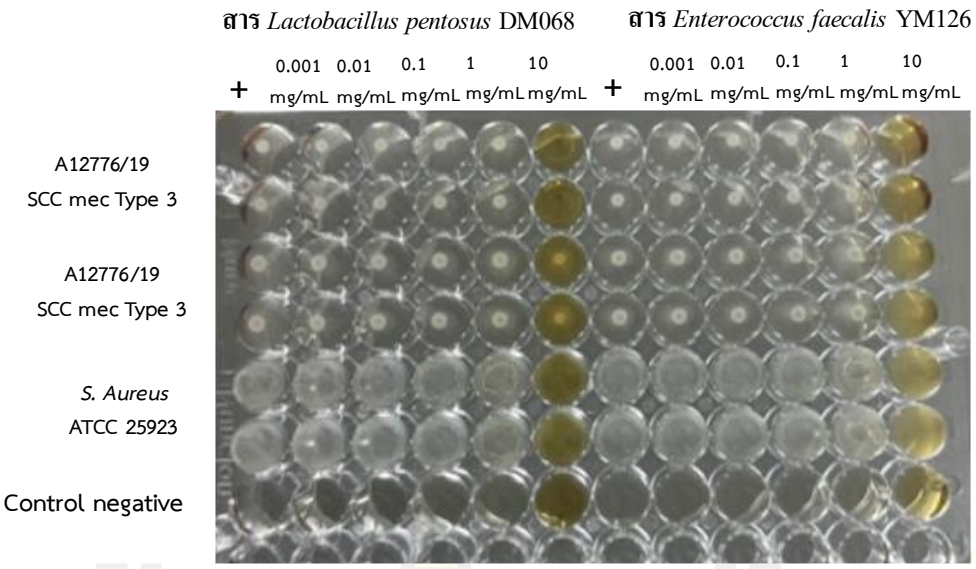
รูปภาพที่ 11 การยับยั้งเชื้อ mec 3 เชื้อ mec 4 และเชื้อ *S. aureus* ATcc 25923 ของกระชายหมักร่วมกับเชื้อ *L. pentosus* VM095 โดยเพิ่มความเข้มข้นด้วยวิธี Freeze Dry

4.5.2 ผลการยับยั้งแบคทีเรีย MRSA โดยการหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ด้วยวิธี Broth microdilution ของน้ำหมักกระชายขาวร่วมกับแบคทีเรียกรดแลกติก ที่ทำแห้ง ด้วยวิธีอบแห้งด้วยตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 40 องศา เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

น้ำกระชายขาวหมักเสริมด้วยฤทธิ์ของเชื้อ *Lactobacillus* spp. 8 สายพันธุ์ *Lactococcus* sp. 1 สายพันธุ์ และ *Enterococcus* sp. 1 สายพันธุ์ ซึ่งปัจจัยที่ศึกษา 2 ปัจจัย ได้แก่ สายพันธุ์ของเชื้อ Lactic acid bacteria และระยะเวลาในการหมักที่มีผลต่อการยับยั้งแบคทีเรีย MRSA โดยคัดเลือกน้ำหมักที่มีปริมารสารต้านอนุมูลอิสระและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูงสุดมาทำการทดลองโดยใช้เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. pentosus* DM068, *E. faecalis* YM126, L. lactis A7 และ *L. pentosus* VM095 ด้วยวิธีอบแห้งที่อุณหภูมิ 40 องศา เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อทดสอบการยับยั้งด้วยความเข้มข้นระดับ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลลิตร นำมาเจือจางลงที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10 mg และเจือจางลงเป็น 1, 0.1, 0.01, และ 0.001 มิลลิกรัมต่อมิลลลิตร ผลการทดลองพบว่า น้ำกระชายขาวหมักเสริมด้วยฤทธิ์ของเชื้อ *L. lactis* A7, *L. pentosus* DM068, *E. faecalis* YM126 และ *Lactobacillus pentosus* VM095 ไม่ยับสามารถยั้งแบคทีเรีย MRSA



รูปภาพที่ 12 การยับยั้งเชื้อ mec 3 เชื้อ mec 4 และเชื้อ *S.aureus* ATcc 25923 ของกระชายหมักร่วมกับเชื้อ *L. pentosus* VM095 และ *L. lactis* A7 โดยเพิ่มความเข้มข้นด้วยวิธีอบแห้งที่อุณหภูมิ 40 องศา เวลา 48 ชั่วโมง



รูปภาพที่ 13 การยับยั้งเชื้อ mec 3 เชื้อ mec 4 และเชื้อ *S. aureus* ATcc 25923 ของกระชายหมักร่วมกับเชื้อ *L. pentosus* VM095 และ *L. lactis* A7 โดยเพิ่มความเข้มข้นด้วยวิธีอบแห้งที่อุณหภูมิ 40 องศา เวลา 48 ชั่วโมง

จากการทดลองการยับยั้งแบคทีเรีย MRSA โดยคัดเลือกน้ำหมักที่มีปริมารสารต้านอนุมูลอิสระและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูงสุดมาทำการทดลองโดยใช้เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. pentosus* DM068, *E. faecalis* YM126, *L. lactis* A7 และ *L. pentosus* VM095 พบว่าน้ำหมักที่เสริมด้วยฤทธิ์แบคทีเรียผลิตกรดแลกติดทั้ง 4 สายพันธุ์ ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรีย MRSA ได้ ซึ่งการศึกษาการเพิ่มความเข้มข้นของน้ำหมักด้วยวิธีต่างๆ ก็ไม่สามารถยับยั้งแบคเรีย MRSA ได้ ซึ่งอาจสืบเนื่องมาจากน้ำหมักที่แบคทีเรียผลิตกรดแลกติกออกมานั้นมีปริมาณกรดน้อยกว่าที่จะสามารถยับยั้งแบคทีเรีย MRSA และในน้ำหมักกระชายขาวถึงจะมีปริมารสารต้านอนุมูลอิสระและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูงก็ไม่มีผลต่อการยับยั้งแบคเรีย MRSA ในทำนองเดียวกันน้ำหมักกระชายขาวที่เสริมด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกอาจจะสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคตัวอื่นก็เป็นได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ จากรายงานก่อนหน้านี้ของ หนูหีต วารีรัตน์, (2557) ศึกษาการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนบนผิวสัมผัส โดยใช้สารสกัดจากพืชตระกูลขิง โดยใช้ส่วนเหง้าสด 4 ชนิดของพืชตระกูลขิง ได้แก่ ขิง ข่า กระชาย และขมิ้นขาว โดยการสกัดสารด้วยน้ำและเอทานอล และนำมาทดสอบการยับบั้งเชื้อแบคทีเรีย 4 ชนิด ได้แก่ *Staphylococus aureus*, *Bacillus cereus*, *Esherichia* และ *Psudomonas aeruginosa* ด้วยวิธี Agar well diffusion โดยทำการทดสอบที่ความเข้มข้นของสารสกัด คือ 100, 200, และ 300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า สารสกัดจากกระชาย

สามารถยับยั้งเชื้อ *B.cereus* ได้ดีที่สุด โดยค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (Minimal Inhibition Concentration : MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (Minimal Bactericidal Concentration : MBC) เท่ากับ 0.05 และ 0.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และรายงานก่อนหน้านี้ของ Bhamarapravati et al, (2006) ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของกระชายขาว และจันทน์เทศหอม ต่อต้านเชื้อ *Helicobacter pylori* พบว่า การทดสอบฤทธิ์ต้าน *H. pylori* ในหลอดทดลอง โดยใช้จันทน์เทศหอม รากของกระชายขาว และกรดไดไฮโดรกัวเอเรติกนึ่งฆ่าเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อในเลือด had MIC เท่ากับ 125, 150, 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ MBC เท่ากับ 150, 175, 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สารประกอบทั้งสามมีฤทธิ์ต้าน *H. pylori* ในระดับเดียวกันกับยาที่ใช้ในปัจจุบันในการรักษาแผลในกระเพาะอาหาร ดังนั้น สารประกอบทั้งสามจาก *B. rotunda* และ *M. fragrans* จึงมีศักยภาพในการพัฒนายาต่อไป การทดลองในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าพืชและเครื่องเทศที่ใช้ในการแพทย์แผนไทยเพื่อรักษาอาการอาหารไม่ย่อยและแผลในกระเพาะอาหารมีสารประกอบที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *H. pylori* ในหลอดทดลอง ผลการวิจัยชี้ให้เห็นว่าส่วนผสมของอาหารไทยบางชนิดในอาหารปกติอาจมีส่วนทำให้อัตราการเกิดมะเร็งกระเพาะอาหารในคนไทยต่ำลงโดยส่งผลต่อการเติบโตของเชื้อ *H. pylori*

การศึกษาก่อนหน้านี้ของ Zainin et al, (2013) ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากกระชายขาวต่อเชื้อ *Escherichia coli* ผลการวิจัยพบว่าสารสกัดกระชายขาวไวต่อเชื้อ *E. coli* ทุกสายพันธุ์ ซึ่งค่า MIC และ MBC ของสารสกัดกระชายขาว เทียบกับ *E. coli* อยู่ในช่วง 0.019 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.039มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร – 5.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งเส้นโค้งเวลาฆ่าถูกสร้างขึ้นที่ความเข้มข้น 0x MIC, 1/2x MIC, 1x MIC และ 2x MIC ของสายพันธุ์ *E. coli* ทั้งหมดสามารถฆ่าได้ด้วยความเข้มข้น 2x MIC หลังจาก 2 ชั่วโมง ผลการวิจัยพบว่าสารสกัดกระชายขาวมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียกับเชื้อ *E. coli*

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Wikaningtyas & Sukandar, (2016) ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของพืช และฤทธิ์การต้านแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างทางคลินิก พบว่า ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียที่ดีที่สุดซึ่งคำนวณจากค่าความเข้มข้นในการยับยั้งขั้นต่ำเทียบกับ MRSA โดยสารสกัด *Kaempferia pandurata* (Roxb) (K. pandurata) มีค่า MIC เท่ากับ 256 มิลลิกรัมต่อมิลลลิลิตร และสารสกัด *Senna alata* (S. alata) เท่ากับ 512 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งในใบของ *S. alata* แห้ง และสารสกัดที่สกัดจากใบมีสารฟลาโวนอยด์ อัลคาลอยด์ ซาโปนิน ควิโนน แทนนิน และสเตอรอล ในขณะที่ *K. Pandurate* แห้งและสารสกัดนั้น พบว่า มีสารฟลาโวนอยด์ และสเตอรอล

บทที่ 5
บทสรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาการหมักน้ำกระชายขาวด้วยเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก 10 สายพันธุ์ ซึ่งปัจจัยที่ศึกษา 2 ปัจจัย ได้แก่ สายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก และระยะเวลาในการหมัก เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า กระบวนการหมักกระชายขาวด้วยแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก ส่งผลให้จำนวนเชื้อ lactic acid bacteria เพิ่มขึ้น และค่า pH ลดลง (ที่เวลาในการหมัก 72 ชั่วโมง จำนวนเชื้อ มีค่าระหว่าง Log 4.0 -6.8 CFU/ml และค่า pH 2.8-3.7 นอกจากนี้ยังต่อการเพิ่มฤทธิ์ทางชีวภาพและกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของน้ำกระชายขาวหมักได้ และเมื่อระยะเวลาในการหมักเพิ่มขึ้น ฤทธิ์ทางชีวภาพและกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระมีค่าเพิ่มขึ้น ซึ่งสายพันธุ์ที่มีค่าการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH สูงสุดคือ *L. pentosus* DM068 เท่ากับ 83.42±1.30 ไมโครกรัมโทรล็อกซ์ต่อมิลลิลิตร และวิธี FRAP คือ *L. pentosus* VM095 เท่ากับ 295.82±2.15 ไมโครกรัม Fe(II) ต่อมิลลิลิตร สายพันธุ์ *E. faecalis* YM126 มีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดสูงที่สุดเท่ากับ 226.43±14.29 ไมโครกรัมรูตินต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สายพันธุ *L. lactis A7* และสายพันธุ *L. pentosus* DM068 มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุดเท่ากับ 298.85±1.89, 281.83±1.76 ไมโครกรัมกรดแกลลิกต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และในการทดสอบผลการยับยั้งแบคทีเรีย MRSA พบว่า กระชายขาวที่หมักด้วยแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรีย MRSA ได้ ทั้งนี้อาจเกิดเนื่องจากปริมาณความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compounds) เช่น phenolic compound, flavonoid compound, organic acid อาจจะไม่เข้มข้นสูงพอที่จะยับยั้งเชื้อทดสอบ หรืออาจเป็นไปได้ว่าสารดังกล่าวอาจไม่มีฤทธิ์เชื้อทดสอบ ดังนั้นในอนาคตอาจมีการคัดเลือกสมุนไพรที่มีฤทธิ์ที่จำเพาะเจาะจงในการยับยั้งเชื้อทดสอบดังกล่าว หรืออาจปรับเปลี่ยนกรรมวิธีการเตรียมสารสกัด เช่น อาจเพิ่มความเข้มข้นของกระชายขาวให้มากกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ และเพิ่มระยะเวลาในการหมักให้นานขึ้น ทั้งนี้เพื่อเป็นการพัฒนาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพ เพื่อเพิ่มมูลค่าให้กับผลิตภัณฑ์ และน้ำหมักที่ผลิตได้จะนำไปต่อยอดเกี่ยวกับกลไกการต้านแบคทีเรียก่อโรคเพื่อเป็นประโยชน์ในการพัฒนาเป็นยารักษาอาการอักเสบ การผลิตกรดของแบคทีเรียในระหว่างการหมัก สารต้านอนุมูลอิสระ และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เพิ่มขึ้นจะช่วยในการยับยั้งการต้าน

แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการอักเสบได้ ซึ่งจะช่วยพัฒนายาจากพืชสมุนไพรร่วมกับการเสริมฤทธิ์ของแบคทีเรียในการรักษาโรคอาการอักเสบ เพื่อลดการนำเข้าของยาจากต่างประเทศ

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากการทดลองที่ผ่านมาพบว่า สารสกัดกระชายที่หมักร่วมกับเชื้อชนิดต่างๆไม่สามารถยับยั้งเชื้อได้ ในอนาคตอาจจะการศึกษาเพิ่มเติม ดังนี้

5.2.1 อาจมีการศึกษาชนิดของสมุนไพรชนิดอื่นๆเพิ่มเติม

5.2.2 เพิ่มระยะเวลาในการหมัก และมีการศึกษาอัตราส่วนความเข้มข้นที่เหมาะสมในการสกัดเพื่อให้ได้สารออกฤทธิ์สูงสุด

5.2.3 อาจมีการตรวจสอบการรอดชีวิตของเชื้อ เพื่อหาจำนวนจุลินทรีย์ที่เหลือหลังการทดสอบ เช่นการเพาะเลี้ยงในอาหารวุ้น

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

กระทรวงสาธารณสุข. 2541 ยาสมุนไพรสำหรับสาธารณสุขมูลฐาน. โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก. กรุงเทพฯ. 133 น.

ณฐพงศ์ เมธินธรังสรรค์ และดวงเดือน วัฏฏานุรักษ์. (2558). การผลิตน้ำหมักชีวภาพเสริมโพรไบโอติกจากเห็ดหอม. การประชุมวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 2 สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร.

ทศพล พลคำมาก, ธีระ ฤทธิรอด, สิรินดา ยุ่นฉลาด. (2559). การเพิ่มฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำพลูคาวด้วยการผสมกับกระชายดำและหมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก.*วารสารวิจัย มข*. (บศ.) 16 (1) : ม.ค. - มี.ค. 2559.

นิตยา อินทราวัฒนามุทิตา วนาภรณ์. (2015). โรคติดเชื้อในโรงพยาบาลและสถานการณ์การดื้อยา. บทความปริทัศน์ (Review Article), 22(1), 12–14.

บัญญัติ สุขศรีงาม. 2523 สมุนไพร. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ บางแสน. ชลบุรี. 134 น.

บุหรัน พันุ์สวรรค์. (2556). อนุมูลอิสระสารต้านอนุมูลอิสระและการวิเคราห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ. ววารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ปีที่ 21, 3, 275–286.

พงษ์เทพ วิไวพันธ์. 2546 คุณสมบัติของแบคทีเรียแลคติกในอุตสาหกรรมอาหาร. วารสารอาหาร. 33(3) : 173-180 น.

ไมตรี สุทธจิตต์ม 2555 ความรู้พื้นฐานของออกซิเดชัน น.1-14, ในวรพล เองวาณิช(บรรณาธิการ), อนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ, คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา ร่วมกับ สมาคมเพื่อการวิจัยอนุมูลอิสระไทย, สำนักพิมพ์นวัตกรรมสุขภาพเชียงใหม่

เยาวลักษณ์ บานเพียนพรรนิภา ศิริเพิ่มพูล. (2008). ประสิทธิภาพของเคอร์คูมินิยด์ในการยับยั้ง Stapylococus aureus. KKU Res J., 13(1).

ลือชัย บุตคุป. (2554). สารประกอบฟีโนลิกและฤทธิ์ทางชีวภาพ. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม. 20 ตุลาคม 2554

สร้อยศิริ ทวีบูรณ์; บุญนิตย์ ทวีบูรณ์; และ วรานันท์ บัวจีบ.(2544). ผลของสารสกัดบัวบกต่อการยับยั้งแคนดิดา และการนำไปใช้รักษาแคนดิดาในช่องปาก. วารสารทันตมหิดล. 21: 53–60.

หนูหีต วารีรัตน์. (2557). การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนบนผิวสัมผัส โดยใช้สารสกัดพืชตระกูลขิง. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Abu Bakar, M. F., Mohamed, M., Rahmat, A., & Fry, J. (2009). Phytochemicals and antioxidant activity of different parts of bambangan (Mangifera pajang) and tarap (Artocarpus odoratissimus). *Food Chemistry*, *113*(2), 479–483.

Ahmad, I., & Bega, Z. (2001). Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. *Journal of Ethnopharmacology*, *74*(2), 113–123.

Ames, B. N., Shigenaga, M. K., & Hagen, T. M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 90(17), 7915–7922

Asadi, S., & Jamali, M. (2017). Assessment the Frequency of Staphylococcus aureus Golden Methicillin-Resistant (MRSA) and Vancomycin-Resistant VRSA in Determining the MIC Using E-Test. Immunol Disord Immunother, 2(104), 2.

Ara Farhana, J. (2017). Antibacterial Effects of Guava (<i>Psidium guajava</i> L.) Extracts Against Food Borne Pathogens. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*, *6*(1), 1.

Axelsson, L. T., Chung, T. C., Dobrogosz, W. J., & Lindgren, S. E. (1989). Production of a BroadSpectrum Antimicrobial Substance by *Lactobacillus reuteri*. *Microbial Ecology in Health and Disease*, *2*(2), 131–136

Baharudin, M. K. A., Hamid, S. A., & 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.

Bakar, M. F. A., Mohamed, M., Rahmat, A., & Fry, J. (2009). Phytochemicals and antioxidant activity of different parts of bambangan (Mangifera pajang) and tarap (Artocarpus odoratissimus). *Food Chemistry*, *113*(2), 479-483.

Baird-Parker, A.C., 1980. Ácidos Orgânicos.In: International Commission onMicrobiological Specifications for Foods.Ecologia Microbiana de los Alimentos.Zaragoza, ACRIBIA, p. 132-142.

Basri, D., & Fan, S. (2005). The potential of aqueous and acetone extracts of galls of Quercus infectoria as antibacterial agents. *Indian Journal of Pharmacology*, *37*(1), 26.

Biswas, C., Djordjevic, J. T., Zuo, X., Boles, E., Jolliffe, K. A., Sorrell, T. C., & Chen, S. C. A. (2013). Functional characterization of the hexose transporter Hxt13p: An efflux pump that mediates resistance to miltefosine in yeast. *Fungal Genetics and Biology*, *61*, 23–32.

Brewer, J. D., Hundley, M. D., Meves, A., Hargreaves, J., McEvoy, M. T., & Pittelkow, M. R. (2008). Staphylococcal scalded skin syndrome and toxic shock syndrome after tooth extraction. Journal of the American Academy of Dermatology, 59(2), 342–346.

Chaiyasut, C., Kusirisin, W., Lailerd, N., Lerttrakarnnon, P., Suttajit, M., & 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.

Chong, T. E., Teck, F. G., Ming, W. S., Abd Rahman, N., Khalid, N., Karsani, S. A., ... & 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, Boonpleng A. (2003). Ethnomedical uses of Thai zingiberaceous plant. *Journal Medicine*, *10*(1):33-39.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2009). Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically; approved standard-eighth edition. CLSI documents M07-A8. Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, Pa.

Cunha, B., & França, J. (2014). Evaluation of antimicrobial and antitumoral activity of Garcinia mangostana L.(mangosteen) grown in Southeast Brazil. *Acta Cirurgica ...*, *29*(2), 21–28.

Hartman, B. J., & Tomasz, A. (1984). Low-Affinity Penicillin-Binding Protein Associated with r-Lactam Resistance in Staphylococcus aureus. Journal of Bacteriology, 158(2), 513–516.

Humphrey, J. S., Salim, A., Erdos, M. R., Collins, F. S., Brody, L. C., & Klausner, R. D. (1997). Human BRCA1 inhibits growth in yeast: potential use in diagnostic

testing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(11), 5820–5825.

Idris, O., Olatunji, B., & Madufor, P. (2016). In vitro Antibacterial Activity of the Extracts of Peperomia pellucida (L). *British Microbiology Research Journal*, *11*(4), 1–7.

Janardhan, S., Mahendra, J., Girija, A. S. S., Mahendra, L., & Priyadharsini, V. (2017). Antimicrobial effects of Garcinia mangostana on cariogenic microorganisms. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, *11*(1), ZC19-ZC22.

Jing, L. J., Mohamed, M., Rahmat, A., & Bakar, M. F. A. (2010). Phytochemicals, antioxidant properties and anticancer investigations of the different parts of several gingers species (Boesenbergia rotunda, Boesenbergia pulchella var attenuata and Boesenbergia armeniaca). *Journal of Medicinal Plants Research*, *4*(1), 027-032.

Jing, L. J., Bakar, M. A., Mohamed, M., & Rahmat, A. (2011). Effects of selected Boesenbergia species on the proliferation of several cancer cell lines. *Journal of Pharmacology and Toxicology*, *6*(3), 272-282.

Kechagia, M., Basoulis, D., Konstantopoulou, S., Dimitriadi, D., Gyftopoulou, K., Skarmoutsou, N., & Fakiri, E. M. (2013). Health benefits of probiotics: a review. *International Scholarly Research Notices*, 2013.

Kyan, Y., Edwrad, E., & Hang, Y. (2004). Probiotication of tomato juice by lactic acid bacteria. Repubic of Korea: Department of Food and Nutrition, Yeungnam University, Kyungsan, 712-749

Morikawa, T., Funakoshi, K., Ninomiya, K., Yasuda, D., Miyagawa, K., Matsuda, H., & 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.

Palakawong, C., Sophanodora, P., Pisuchpen, S., & Phongpaichit, S. (2010). Antioxidant and antimicrobial activities of crude extracts from mangosteen (Garcinia mangostana L.) parts and some essential oils. *International Food Research Journal*, *17*(3), 583–589.

Pesewu, G. A., Cutler, R. R., & 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.

Pietta, P.G. Flavonoidsasantioxidants. Nat. Prod. 2000;63(7): 1035-342.

Pokorny, J., Yanishlieva, N., & Gordon, M. H. (Eds.). (2001). Antioxidants in food: practical applications. CRC press.

Rice-evans, C. A., Miller, N. J., Bolwell, P. G., Bramley, P. M., & Pridham, J. B. (1995). The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. Free radical research, 22(4), 375-383.

Riswan, S., & Sangat-Roemantyo, H. (2002). Jamu as traditional medicine in Java, Indonesia. ***南太平洋研究***, *23*(1), 1-10.

Salguero, C. P. (2010). A Thai herbal: traditional recipes for health and harmony. ReadHowYouWant. com.

Satir, G., & Guzel-Seydim, Z. B. (2015). Influence of Kefir fermentation on the bioactive substances ofdifferent breed goat milks. *LWT - Food Science and Technology*, *63*(2), 852–858.

Sawangwan, T., Porncharoennop, C., & Nimraksa, H. (2021). Antioxidant compounds from rice bran fermentation by lactic acid bacteria. *AIMS Agriculture and Food*, *6*(2), 578-587.

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.

Singh, G., Tiwari, D., Jain, P. K., & Swami, A. K. (2016). A Critical Review of Endurance Limits of Bituminous Mixes for Developing Countries. *Transportation Research Procedia*, *17*(December 2014), 438–444.

Tang, S. W., Sukari, M. A., & Ee, G. C. L. (2007). Characterization of flavonoid derivatives from Boesenbergia rotunda (L.). *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, *11*(1), 154-159.

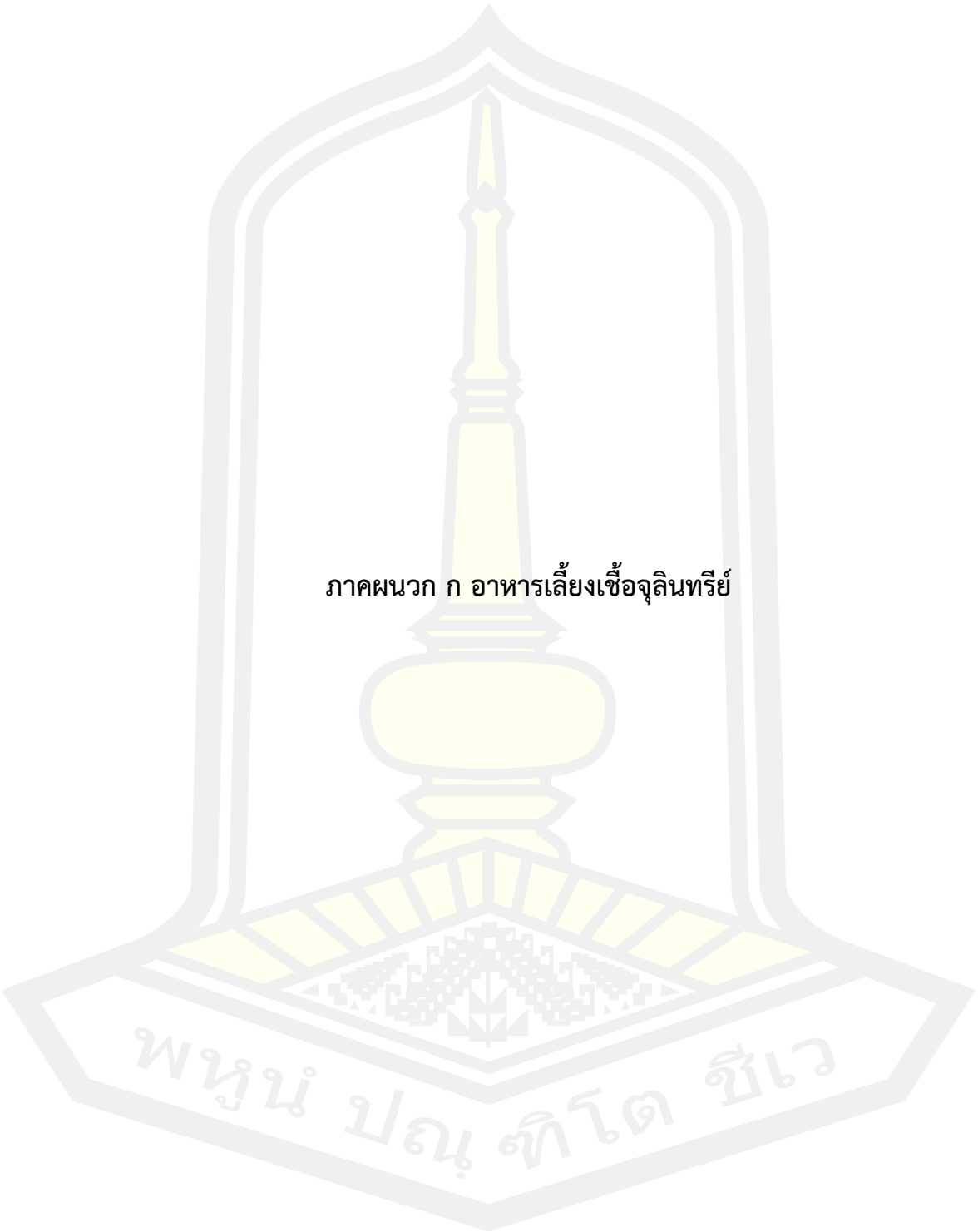
Toursuphap, S. (1998). The Survey of Medicinal Plants at Khao Nang Ram Wildlife Research Station Huai Khakhaeng Wildlife Sanctuary Uthaitani Provice. Kasetsart University. (in Thai)

Wei, L. S., Wee, W., Siong, J. Y. F., & Syamsumir, D. F. (2011). Characterization of anticancer, antimicrobial, antioxidant properties and chemical compositions of Peperomia pellucida leaf extract. *Acta Medica Iranica*, *49*(10), 670–674.

World Union of Wound Healing Societies (WUWHS). Principles of best practice: wound infection in clinical practice. an international consensus [internet]. London: MEP Ltd; ©2008. [Updated 2008; cited 2016 Nov 24]. Available from: www.mepltd.co.uk

Yusuf, N. A., M Annuar, M. S., & Khalid, N. (2013). Existence of bioactive flavonoids in rhizomes and plant cell cultures of 'Boesenbergia rotund'(L.) Mansf. Kulturpfl. *Australian Journal of Crop Science*, *7*(6), 730-734.

ภาคผนวก

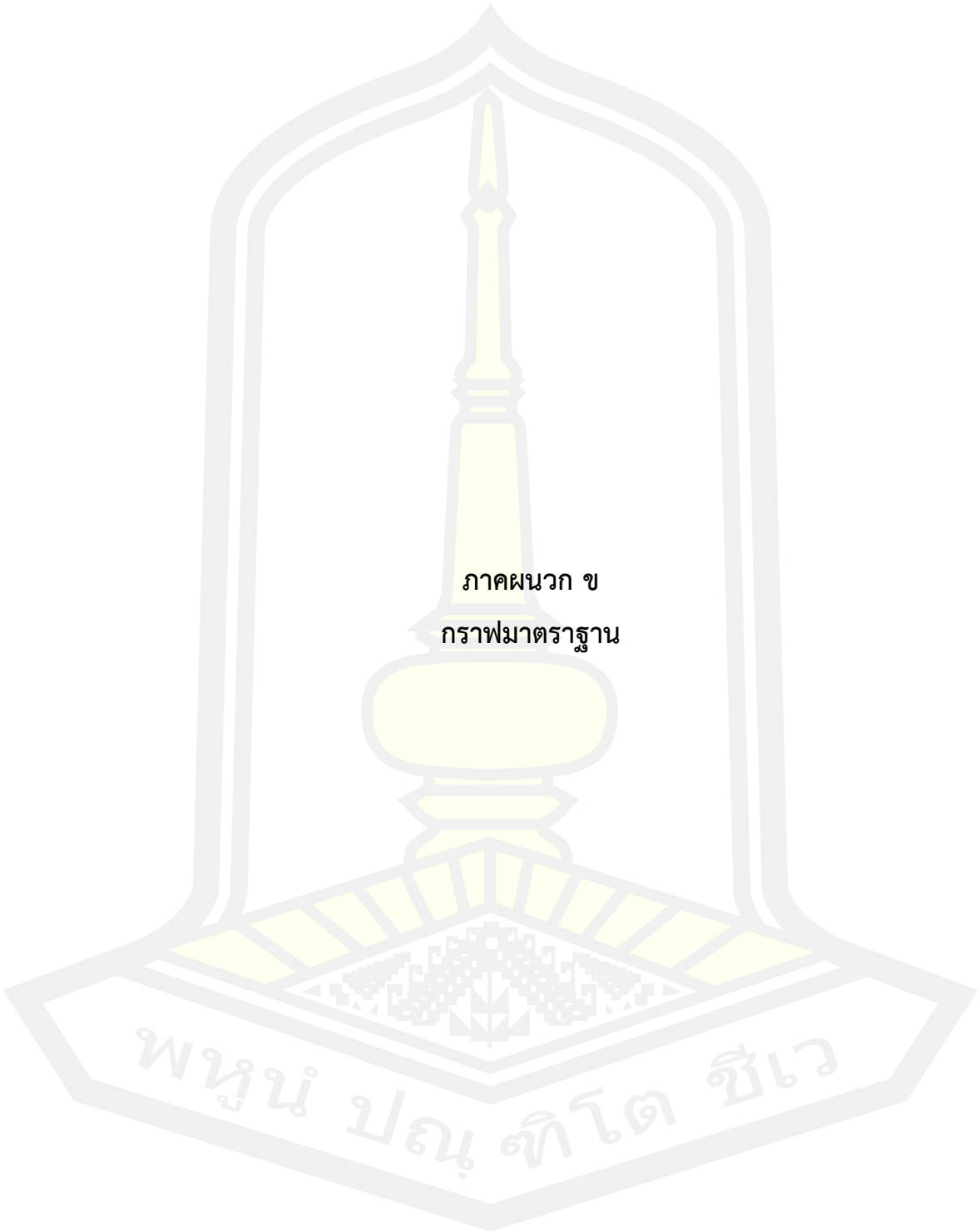


ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

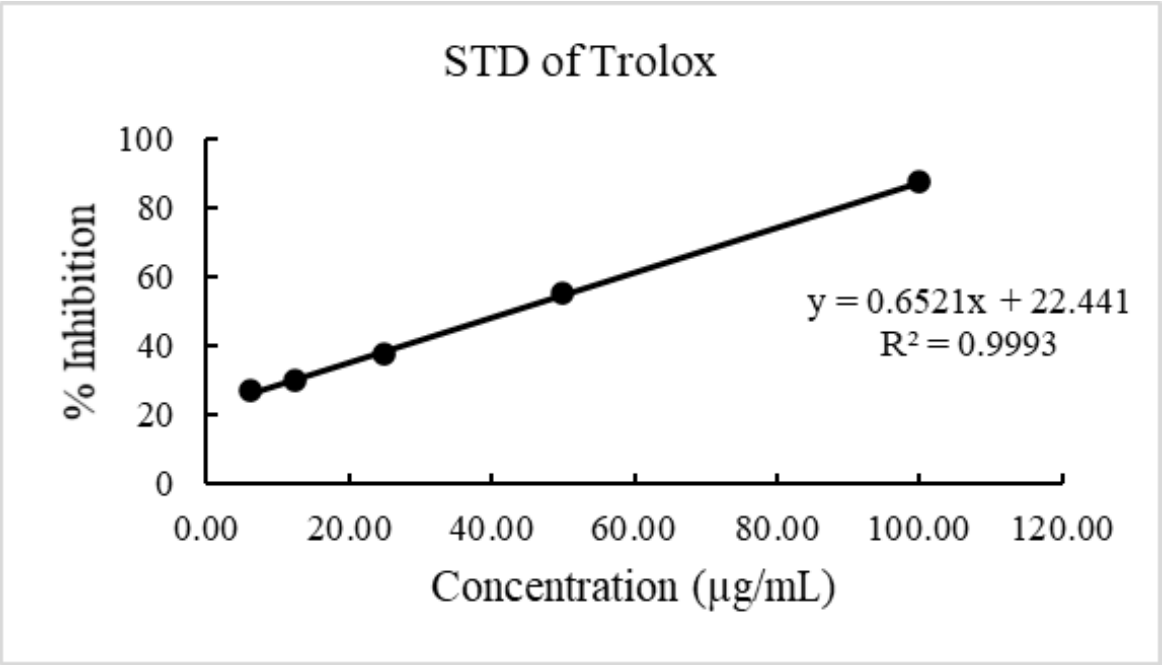
1. *Lactobacillus* MRS Broth (MRS)

Proteose peptone	10.0	กรัม
Beef extract	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Dextrose	20.0	กรัม
Polysorbate 80	1.0	กรัม
$C_6H_{11}NO_7$	2.0	กรัม
$C_2H_3NaO_2$	5.0	กรัม
$MgSO_4$	0.10	กรัม
$MNSO_4 \cdot H_2O$	0.05	กรัม
K_2HPO_4	2.0	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร
pH	6	

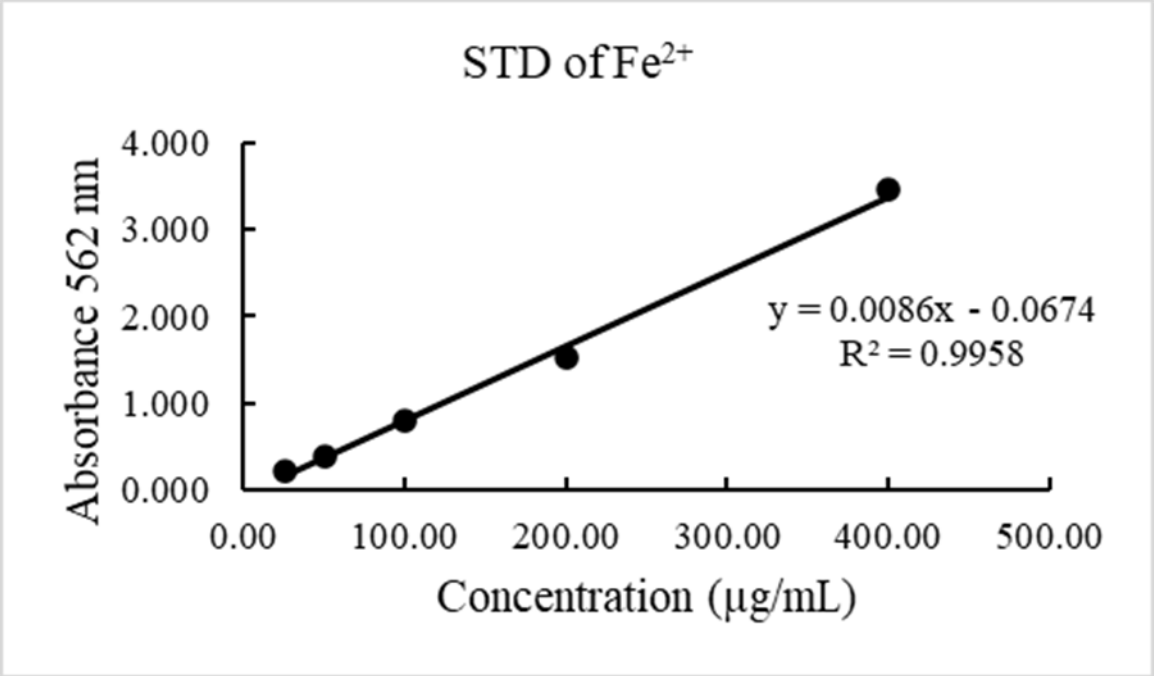
ผสมสารส่วนประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกัน ปรับ pH และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที



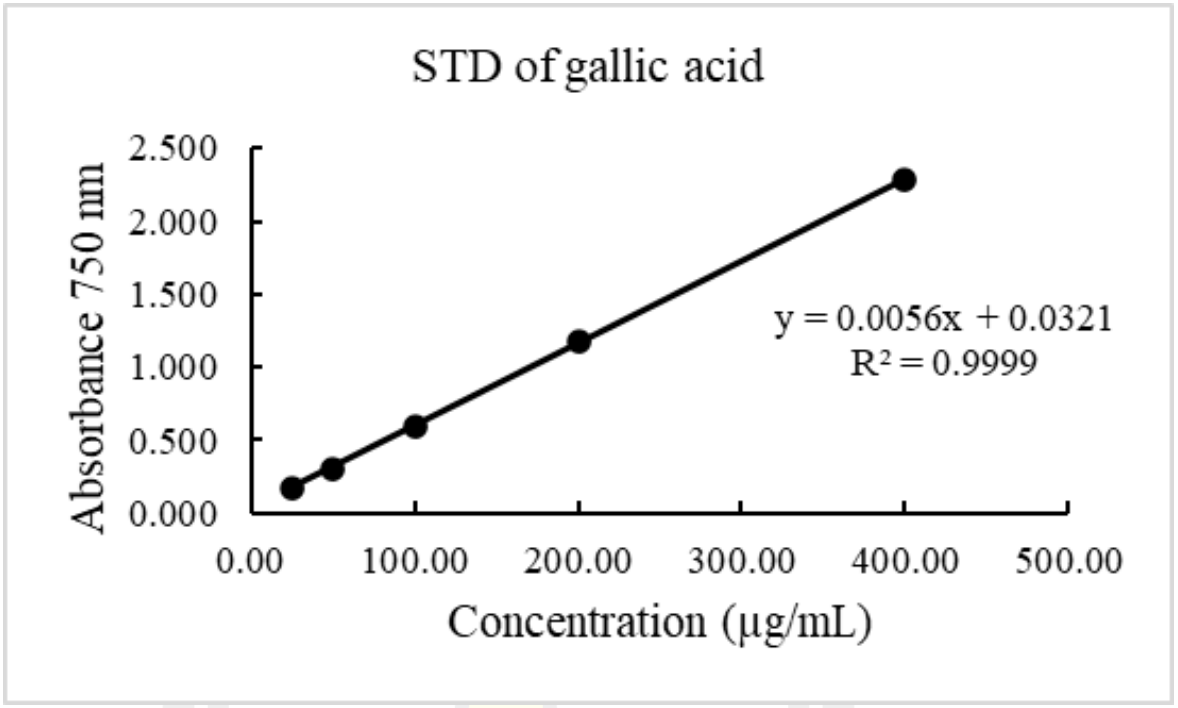
ภาคผนวก ข
กราฟมาตราฐาน



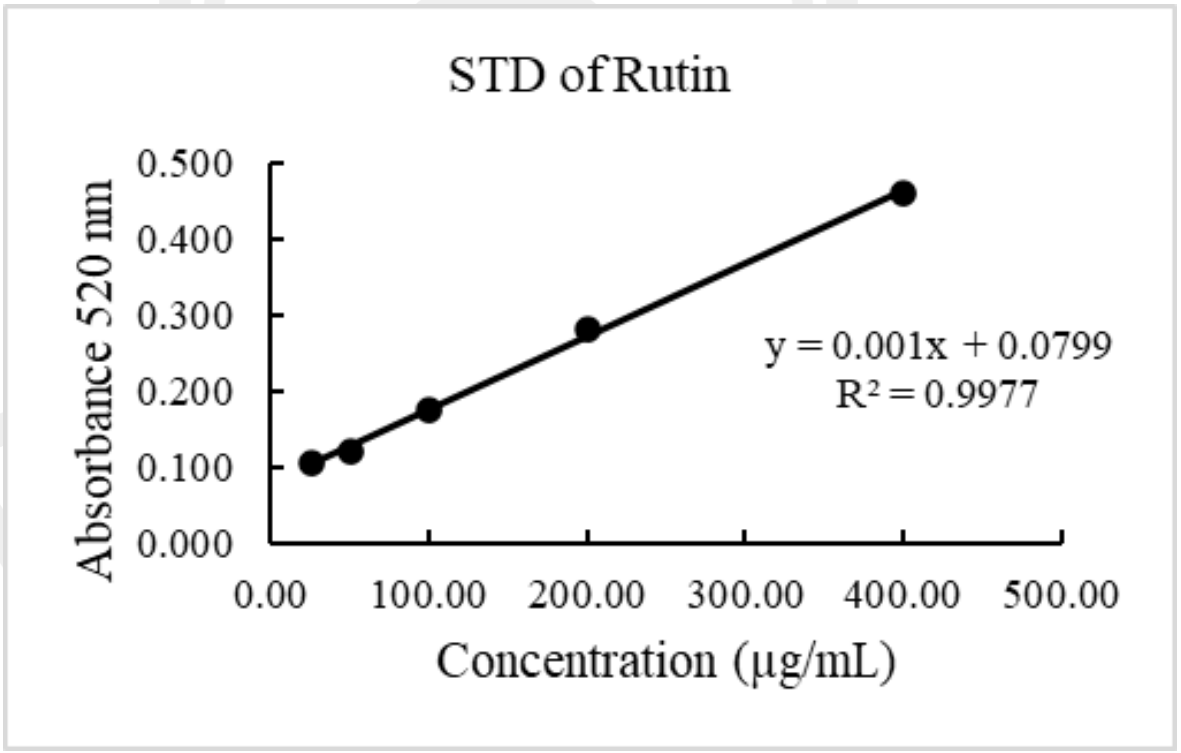
รูปภาพที่ 14 กราฟของสารมาตรฐานโทรล็อกซ์ (Trolox)



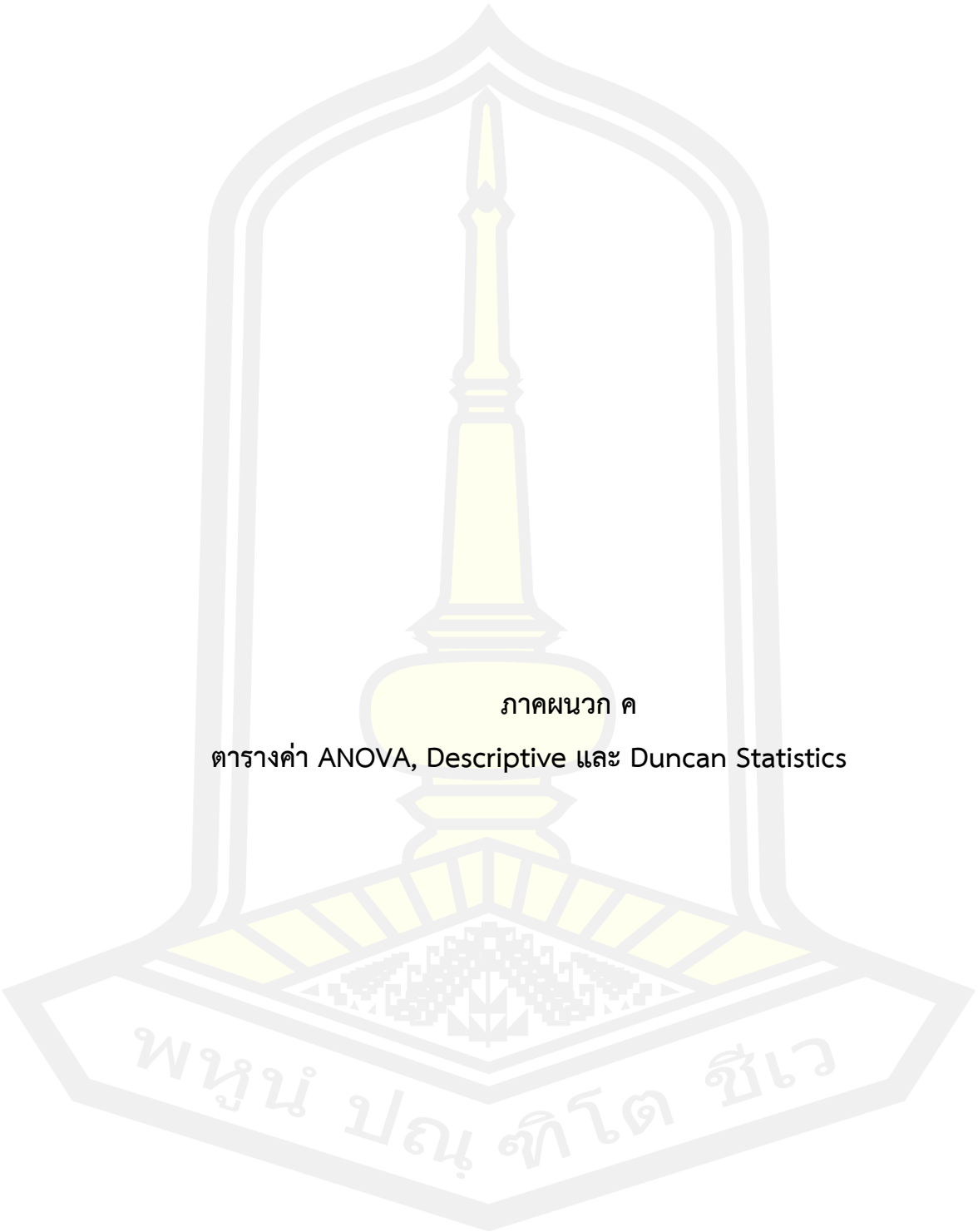
รูปภาพที่ 15 กราฟของสารมาตรฐานเฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)



รูปภาพที่ 16 กราฟของสารมาตรฐานกรดแกลลิก



รูปภาพที่ 17 กราฟของสารมาตรฐานรูติน



ภาคผนวก ค

ตารางค่า ANOVA, Descriptive และ Duncan Statistics

ตารางที่ 6 Descriptive ของเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกและระยะเวลาในการหมัก

Descriptive Statistics

	MO	Time	Mean	Std. Deviation	N
DPPH	*Lactobacillus pentosus* JM085	0 h	36.8159	3.41807	3
		24 h	49.3303	3.15329	3
		48 h	59.0455	2.58151	3
		72 h	68.0355	.67511	3
		Total	53.3068	12.32286	12
	Lactobacillus pentosus JM0812	0 h	37.1986	7.26035	3
		24 h	47.3402	5.60145	3
		48 h	61.8572	4.14140	3
		72 h	69.0344	.61795	3
		Total	53.8576	13.63893	12
	Lactobacillus pentosus UM055	0 h	39.5714	.73813	3
		24 h	57.7880	2.05807	3
		48 h	60.1924	4.59539	3
		72 h	69.8483	1.47799	3
		Total	56.8500	11.65738	12
	Lactobacillus pentosus UM054	0 h	33.3333	1.78726	3
		24 h	46.7662	.51771	3
		48 h	58.3056	2.28628	3
		72 h	71.6981	.29365	3
		Total	52.5258	14.84794	12
	Lactobacillus pentosus YM122	0 h	35.9357	4.73237	3
		24 h	60.1990	3.16580	3
		48 h	63.7070	3.10766	3
		72 h	70.3663	1.73368	3

	Total	57.5520	13.88014	12
Lactobacillus pentosus VM096	0 h	35.6678	1.44467	3
	24 h	50.0574	4.88046	3
	48 h	62.2272	4.02831	3
	72 h	68.9604	.55863	3
	Total	54.2282	13.52978	12
Lactobacillus pentosus DM068	0 h	39.1504	3.72206	3
	24 h	59.8546	.76445	3
	48 h	69.8113	1.66482	3
	72 h	76.8405	.84768	3
	Total	61.4142	14.94120	12
Lactobacillus pentosus VM095	0 h	38.9208	1.43857	3
	24 h	35.1703	2.10556	3
	48 h	49.0566	4.99815	3
	72 h	65.6678	.56955	3
	Total	47.2039	12.56587	12
Lactococcus lactis A7	0 h	36.5480	1.29045	3
	24 h	53.9992	.51771	3
	48 h	60.0814	1.95519	3
	72 h	70.2183	1.11173	3
	Total	55.2117	12.82797	12
Enterococcus faecalis YM126	0 h	37.1986	4.10919	3
	24 h	57.4053	4.90874	3
	48 h	70.1443	2.80121	3
	72 h	73.8439	1.68443	3
	Total	59.6480	15.27157	12
Total	0 h	37.0341	3.46873	30
	24 h	51.7910	7.95119	30

		48 h	61.4428	6.44122	30
		72 h	70.4514	3.13416	30
		Total	55.1798	13.61732	120
FRAP	*Lactobacillus pentosus* JM085	0 h	220.1240	1.42095	3
		24 h	237.5659	3.82191	3
		48 h	268.9612	.29263	3
		72 h	276.3256	.76249	3
		Total	250.7442	23.98328	12
	Lactobacillus pentosus JM0812	0 h	219.0388	4.66036	3
		24 h	240.8605	5.12024	3
		48 h	266.2868	.52433	3
		72 h	277.1395	.30765	3
		Total	250.8314	23.77957	12
	Lactobacillus pentosus UM055	0 h	224.5814	1.62791	3
		24 h	232.4496	2.72781	3
		48 h	267.0233	.30765	3
		72 h	289.5039	.52433	3
		Total	253.3895	27.46313	12
	Lactobacillus pentosus UM054	0 h	230.2403	5.45686	3
		24 h	227.7597	3.05956	3
		48 h	263.5736	.44023	3
		72 h	281.0155	.85711	3
		Total	250.6473	23.68151	12
	Lactobacillus pentosus YM122	0 h	235.3178	2.48667	3
		24 h	216.7132	5.49513	3
		48 h	266.7519	.44023	3
		72 h	284.1938	1.29657	3
		Total	250.7442	27.61773	12
		0 h	231.3256	2.21846	3

Lactobacillus pentosus VM096	24 h	221.2868	4.32791	3
	48 h	266.2481	.29263	3
	72 h	289.9690	.59670	3
	Total	252.2074	28.75258	12
Lactobacillus pentosus DM068	0 h	225.5116	2.44186	3
	24 h	238.6899	5.39080	3
	48 h	267.4884	.53286	3
	72 h	284.1938	2.56166	3
	Total	253.9709	24.31328	12
Lactobacillus pentosus VM095	0 h	227.4884	10.19085	3
	24 h	255.5116	2.65921	3
	48 h	274.2326	.46512	3
	72 h	295.8217	2.15142	3
	Total	263.2636	26.61589	12
Lactococcus lactis A7	0 h	229.9302	3.13523	3
	24 h	228.4961	8.58919	3
	48 h	266.7519	.44023	3
	72 h	277.8372	.64741	3
	Total	250.7539	23.20631	12
Enterococcus faecalis YM126	0 h	235.5504	5.50620	3
	24 h	245.0465	2.68199	3
	48 h	269.2713	.66119	3
	72 h	284.9690	1.23241	3
	Total	258.7093	20.56329	12
Total	0 h	227.9109	6.71269	30
	24 h	234.4380	11.79933	30
	48 h	267.6589	2.72009	30
	72 h	284.0969	6.19242	30
	Total	253.5262	24.48032	120

TFC	*Lactobacillus pentosus* JM085	0 h	92.1000	33.80828	3
		24 h	173.4333	5.50757	3
		48 h	190.4333	6.35085	3
		72 h	219.7667	7.23418	3
		Total	168.9333	51.73505	12
	Lactobacillus pentosus JM0812	0 h	52.4333	5.13160	3
		24 h	150.1000	13.74773	3
		48 h	155.7667	2.08167	3
		72 h	182.4333	3.78594	3
		Total	135.1833	51.91507	12
	Lactobacillus pentosus UM055	0 h	50.7667	5.50757	3
		24 h	162.4333	8.08290	3
		48 h	182.7667	6.80686	3
		72 h	192.7667	8.96289	3
		Total	147.1833	59.59173	12
	Lactobacillus pentosus UM054	0 h	69.1000	15.09967	3
		24 h	159.4333	5.50757	3
		48 h	181.4333	13.79613	3
		72 h	181.4333	13.79613	3
		Total	147.8500	49.59128	12
	Lactobacillus pentosus YM122	0 h	51.4333	8.32666	3
		24 h	159.7667	11.84624	3
		48 h	181.1000	7.21110	3
		72 h	207.1000	4.35890	3
		Total	149.8500	62.28691	12
	Lactobacillus pentosus VM096	0 h	50.1000	2.64575	3
		24 h	164.4333	2.30940	3
		48 h	170.4333	5.85947	3
		72 h	174.1000	17.57840	3

		Total	139.7667	54.78443	12
	Lactobacillus pentosus DM068	0 h	49.7667	11.06044	3
		24 h	148.4333	23.11565	3
		48 h	159.4333	4.61880	3
		72 h	188.4333	9.23760	3
		Total	136.5167	55.75182	12
	Lactobacillus pentosus VM095	0 h	57.4333	7.50555	3
		24 h	169.7667	22.23361	3
		48 h	174.7667	7.37111	3
		72 h	196.7667	10.96966	3
		Total	149.6833	57.78402	12
	Lactococcus lactis A7	0 h	64.4333	7.57188	3
		24 h	167.1000	14.52584	3
		48 h	182.7667	6.11010	3
		72 h	192.4333	9.60902	3
		Total	151.6833	54.12689	12
	Enterococcus faecalis YM126	0 h	50.4333	3.78594	3
		24 h	174.1000	7.00000	3
		48 h	211.1000	4.58258	3
		72 h	226.4333	14.29452	3
		Total	165.5167	72.54899	12
	Total	0 h	58.8000	17.03374	30
		24 h	162.9000	13.88971	30
		48 h	179.0000	16.23608	30
		72 h	196.1667	18.61392	30
		Total	149.2167	56.15961	120
TPC	*Lactobacillus pentosus* JM085	0 h	115.8747	1.55670	3
		24 h	275.9940	25.37040	3
		48 h	277.1843	2.03054	3

	72 h	275.5177	2.41544	3
	Total	236.1427	73.34481	12
Lactobacillus pentosus JM0812	0 h	115.6963	3.09287	3
	24 h	268.3153	14.89779	3
	48 h	265.1603	1.23726	3
	72 h	275.0417	6.31938	3
	Total	231.0534	70.01806	12
Lactobacillus pentosus UM055	0 h	110.3987	7.53495	3
	24 h	249.9820	11.45213	3
	48 h	261.2323	8.20851	3
	72 h	273.1967	7.89767	3
	Total	223.7024	69.27872	12
Lactobacillus pentosus UM054	0 h	111.5297	3.50992	3
	24 h	254.3867	8.66434	3
	48 h	259.2680	1.96400	3
	72 h	274.2677	.30888	3
	Total	224.8630	68.89025	12
Lactobacillus pentosus YM122	0 h	99.0897	24.07134	3
	24 h	227.8987	12.05675	3
	48 h	236.4703	6.59796	3
	72 h	271.1133	10.83320	3
	Total	208.6430	69.36086	12
Lactobacillus pentosus VM096	0 h	104.8630	6.04047	3
	24 h	257.1847	12.45734	3
	48 h	258.1963	1.72243	3
	72 h	271.7083	6.92600	3
	Total	222.9881	71.79130	12
	0 h	165.8153	103.82216	3

Lactobacillus pentosus DM068	24 h	276.2917	14.37917	3
	48 h	278.8513	10.51033	3
	72 h	281.8277	1.76161	3
	Total	250.6965	68.13359	12
Lactobacillus pentosus VM095	0 h	116.8270	12.84523	3
	24 h	233.4943	16.61624	3
	48 h	255.2200	5.32834	3
	72 h	267.0060	1.01535	3
	Total	218.1368	63.05100	12
Lactococcus lactis A7	0 h	96.1130	18.57236	3
	24 h	291.3513	15.82785	3
	48 h	290.9347	5.32801	3
	72 h	298.8513	1.89260	3
	Total	244.3126	90.06382	12
Enterococcus faecalis YM126	0 h	106.7677	22.85642	3
	24 h	234.0893	16.34626	3
	48 h	252.5420	.91648	3
	72 h	271.5297	4.53272	3
	Total	216.2322	68.52652	12
Total	0 h	114.2975	34.84109	30
	24 h	256.8988	24.07591	30
	48 h	263.5060	15.56880	30
	72 h	276.0060	9.71604	30
	Total	227.6771	69.91152	120

ตารางที่ 7 Multivariate Tests ของเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกและระยะเวลาในการหมัก

Multivariate Tests[c]

Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Intercept	Pillai's Trace	1.000	188545.811[a]	4.000	77.000	.000
	Wilks' Lambda	.000	188545.811[a]	4.000	77.000	.000
	Hotelling's Trace	9794.588	188545.811[a]	4.000	77.000	.000
	Roy's Largest Root	9794.588	188545.811[a]	4.000	77.000	.000
MO	Pillai's Trace	2.265	11.607	36.000	320.000	.000
	Wilks' Lambda	.028	12.918	36.000	290.292	.000
	Hotelling's Trace	6.369	13.358	36.000	302.000	.000
	Roy's Largest Root	2.741	24.368[b]	9.000	80.000	.000
Time	Pillai's Trace	2.022	40.833	12.000	237.000	.000
	Wilks' Lambda	.000	326.469	12.000	204.014	.000
	Hotelling's Trace	161.989	1021.429	12.000	227.000	.000
	Roy's Largest Root	145.089	2865.508[b]	4.000	79.000	.000
MO * Time	Pillai's Trace	2.047	3.107	108.000	320.000	.000
	Wilks' Lambda	.035	3.791	108.000	308.223	.000
	Hotelling's Trace	6.881	4.811	108.000	302.000	.000
	Roy's Largest Root	4.628	13.711[b]	27.000	80.000	.000

a. Exact statistic

b. The statistic is an upper bound on F that yields a lower bound on the significance level.

c. Design: Intercept + MO + Time + MO * Time

ตารางที่ 8 Tests of Between-Subjects Effects ของกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ สารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ (แบคทีเรียผลิตกรดแลคติก)

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	DPPH	21340.037[a]	39	547.180	60.271	.000
	FRAP	70395.470[b]	39	1805.012	157.026	.000
	TFC	364968.367[c]	39	9358.163	72.362	.000
	TPC	550677.509[d]	39	14119.936	36.498	.000
Intercept	DPPH	365377.560	1	365377.560	40245.699	.000
	FRAP	7713061.826	1	7713061.826	670995.551	.000
	TFC	2671873.633	1	2671873.633	20660.148	.000
	TPC	6220421.602	1	6220421.602	16079.000	.000
MO	DPPH	1728.862	9	192.096	21.159	.000
	FRAP	1948.221	9	216.469	18.832	.000
	TFC	13376.033	9	1486.226	11.492	.000
	TPC	18236.421	9	2026.269	5.238	.000
Time	DPPH	18395.924	3	6131.975	675.426	.000
	FRAP	64644.218	3	21548.073	1874.568	.000
	TFC	343612.700	3	114537.567	885.657	.000
	TPC	519846.951	3	173282.317	447.913	.000
MO * Time	DPPH	1215.251	27	45.009	4.958	.000
	FRAP	3803.032	27	140.853	12.253	.000
	TFC	7979.633	27	295.542	2.285	.002
	TPC	12594.137	27	466.450	1.206	.257
Error	DPPH	726.294	80	9.079		
	FRAP	919.596	80	11.495		
	TFC	10346.000	80	129.325		

	TPC	30949.296	80	386.866		
Total	DPPH	387443.891	120			
	FRAP	7784376.893	120			
	TFC	3047188.000	120			
	TPC	6802048.407	120			
Corrected Total	DPPH	22066.331	119			
	FRAP	71315.067	119			
	TFC	375314.367	119			
	TPC	581626.805	119			

a. R Squared = .967 (Adjusted R Squared = .951)

b. R Squared = .987 (Adjusted R Squared = .981)

c. R Squared = .972 (Adjusted R Squared = .959)

d. R Squared = .947 (Adjusted R Squared = .921)

ตารางที่ 9 Estimates ของกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ สารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ (แบคทีเรียผลิตกรดแลคติก)

Estimates

Dependent Variable	MO	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
DPPH	*Lactobacillus pentosus* JM085	53.307	.870	51.576	55.038
	Lactobacillus pentosus JM0812	53.858	.870	52.127	55.589
	Lactobacillus pentosus UM055	56.850	.870	55.119	58.581
	Lactobacillus pentosus UM054	52.526	.870	50.795	54.257
	Lactobacillus pentosus YM122	57.552	.870	55.821	59.283
	Lactobacillus pentosus VM096	54.228	.870	52.497	55.959
	Lactobacillus pentosus DM068	61.414	.870	59.683	63.145
	Lactobacillus pentosus VM095	47.204	.870	45.473	48.935
	Lactococcus lactis A7	55.212	.870	53.481	56.943
	Enterococcus faecalis YM126	59.648	.870	57.917	61.379
FRAP	*Lactobacillus pentosus* JM085	250.744	.979	248.796	252.692
	Lactobacillus pentosus JM0812	250.831	.979	248.884	252.779

	Lactobacillus pentosus UM055	253.390	.979	251.442	255.337
	Lactobacillus pentosus UM054	250.647	.979	248.700	252.595
	Lactobacillus pentosus YM122	250.744	.979	248.796	252.692
	Lactobacillus pentosus VM096	252.207	.979	250.260	254.155
	Lactobacillus pentosus DM068	253.971	.979	252.023	255.919
	Lactobacillus pentosus VM095	263.264	.979	261.316	265.211
	Lactococcus lactis A7	250.754	.979	248.806	252.702
	Enterococcus faecalis YM126	258.709	.979	256.762	260.657
TFC	*Lactobacillus pentosus* JM085	168.933	3.283	162.400	175.466
	Lactobacillus pentosus JM0812	135.183	3.283	128.650	141.716
	Lactobacillus pentosus UM055	147.183	3.283	140.650	153.716
	Lactobacillus pentosus UM054	147.850	3.283	141.317	154.383
	Lactobacillus pentosus YM122	149.850	3.283	143.317	156.383
	Lactobacillus pentosus VM096	139.767	3.283	133.234	146.300
	Lactobacillus pentosus DM068	136.517	3.283	129.984	143.050
	Lactobacillus pentosus VM095	149.683	3.283	143.150	156.216
	Lactococcus lactis A7	151.683	3.283	145.150	158.216
	Enterococcus faecalis YM126	165.517	3.283	158.984	172.050

TPC	*Lactobacillus pentosus* JM085	236.143	5.678	224.843	247.442
	Lactobacillus pentosus JM0812	231.053	5.678	219.754	242.353
	Lactobacillus pentosus UM055	223.702	5.678	212.403	235.002
	Lactobacillus pentosus UM054	224.863	5.678	213.564	236.162
	Lactobacillus pentosus YM122	208.643	5.678	197.344	219.942
	Lactobacillus pentosus VM096	222.988	5.678	211.689	234.288
	Lactobacillus pentosus DM068	250.696	5.678	239.397	261.996
	Lactobacillus pentosus VM095	218.137	5.678	206.837	229.436
	Lactococcus lactis A7	244.313	5.678	233.013	255.612
	Enterococcus faecalis YM126	216.232	5.678	204.933	227.532

ตารางที่ 10 Pairwise Comparisons ของกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ สารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ (แบคทีเรียผลิตกรดแลคติก)

Pairwise Comparisons

Dependent Variable	(I) MO	(J) MO	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.[a]	95% Confidence Interval for Difference[a]	
						Lower Bound	Upper Bound
DPPH	*Lactobacillus pentosus* JM085	*Lactobacillus pentosus* JM0812	-.551	1.230	.656	-2.999	1.897
		Lactobacillus pentosus UM055	-3.543*	1.230	.005	-5.991	-1.095
		Lactobacillus pentosus UM054	.781	1.230	.527	-1.667	3.229
		Lactobacillus pentosus YM122	-4.245*	1.230	.001	-6.693	-1.797
		Lactobacillus pentosus VM096	-.921	1.230	.456	-3.369	1.527
		Lactobacillus pentosus DM068	-8.107*	1.230	.000	-10.555	-5.659

	Lactobacillus pentosus VM095	6.103*	1.230	.000	3.655	8.551
	Lactococcus lactis A7	-1.905	1.230	.125	-4.353	.543
	Enterococcus faecalis YM126	-6.341*	1.230	.000	-8.789	-3.893
Lactobacillus pentosus JM0812	*Lactobacillus pentosus* JM085	.551	1.230	.656	-1.897	2.999
	Lactobacillus pentosus UM055	-2.992*	1.230	.017	-5.440	-.544
	Lactobacillus pentosus UM054	1.332	1.230	.282	-1.116	3.780
	Lactobacillus pentosus YM122	-3.694*	1.230	.004	-6.142	-1.246
	Lactobacillus pentosus VM096	-.371	1.230	.764	-2.819	2.077
	Lactobacillus pentosus DM068	-7.557*	1.230	.000	-10.005	-5.109

		Lactobacillus pentosus VM095	6.654*	1.230	.000	4.206	9.102
		Lactococcus lactis A7	-1.354	1.230	.274	-3.802	1.094
		Enterococcus faecalis YM126	-5.790*	1.230	.000	-8.238	-3.342
	Lactobacillus pentosus UM055	*Lactobacillus pentosus* JM085	3.543*	1.230	.005	1.095	5.991
		Lactobacillus pentosus JM0812	2.992*	1.230	.017	.544	5.440
		Lactobacillus pentosus UM054	4.324*	1.230	.001	1.876	6.772
		Lactobacillus pentosus YM122	-.702	1.230	.570	-3.150	1.746
		Lactobacillus pentosus VM096	2.622*	1.230	.036	.174	5.070
		Lactobacillus pentosus DM068	-4.564*	1.230	.000	-7.012	-2.116

		Lactobacillus pentosus VM095	9.646*	1.230	.000	7.198	12.094
		Lactococcus lactis A7	1.638	1.230	.187	-.810	4.086
		Enterococcus faecalis YM126	-2.798*	1.230	.026	-5.246	-.350
	Lactobacillus pentosus UM054	*Lactobacillus pentosus* JM085	-.781	1.230	.527	-3.229	1.667
		Lactobacillus pentosus JM0812	-1.332	1.230	.282	-3.780	1.116
		Lactobacillus pentosus UM055	-4.324*	1.230	.001	-6.772	-1.876
		Lactobacillus pentosus YM122	-5.026*	1.230	.000	-7.474	-2.578
		Lactobacillus pentosus VM096	-1.702	1.230	.170	-4.150	.746
		Lactobacillus pentosus DM068	-8.888*	1.230	.000	-11.336	-6.440

		Lactobacillus pentosus VM095	5.322*	1.230	.000	2.874	7.770
		Lactococcus lactis A7	-2.686*	1.230	.032	-5.134	-.238
		Enterococcus faecalis YM126	-7.122*	1.230	.000	-9.570	-4.674
	Lactobacillus pentosus YM122	*Lactobacillus pentosus* JM085	4.245*	1.230	.001	1.797	6.693
		Lactobacillus pentosus JM0812	3.694*	1.230	.004	1.246	6.142
		Lactobacillus pentosus UM055	.702	1.230	.570	-1.746	3.150
		Lactobacillus pentosus UM054	5.026*	1.230	.000	2.578	7.474
		Lactobacillus pentosus VM096	3.324*	1.230	.008	.876	5.772
		Lactobacillus pentosus DM068	-3.862*	1.230	.002	-6.310	-1.414

		Lactobacillus pentosus VM095	10.348*	1.230	.000	7.900	12.796
		Lactococcus lactis A7	2.340	1.230	.061	-.108	4.788
		Enterococcus faecalis YM126	-2.096	1.230	.092	-4.544	.352
	Lactobacillus pentosus VM096	*Lactobacillus pentosus* JM085	.921	1.230	.456	-1.527	3.369
		Lactobacillus pentosus JM0812	.371	1.230	.764	-2.077	2.819
		Lactobacillus pentosus UM055	-2.622*	1.230	.036	-5.070	-.174
		Lactobacillus pentosus UM054	1.702	1.230	.170	-.746	4.150
		Lactobacillus pentosus YM122	-3.324*	1.230	.008	-5.772	-.876
		Lactobacillus pentosus DM068	-7.186*	1.230	.000	-9.634	-4.738

		Lactobacillus pentosus VM095	7.024*	1.230	.000	4.576	9.472
		Lactococcus lactis A7	-.984	1.230	.426	-3.431	1.464
		Enterococcus faecalis YM126	-5.420*	1.230	.000	-7.868	-2.972
	Lactobacillus pentosus DM068	*Lactobacillus pentosus* JM085	8.107*	1.230	.000	5.659	10.555
		Lactobacillus pentosus JM0812	7.557*	1.230	.000	5.109	10.005
		Lactobacillus pentosus UM055	4.564*	1.230	.000	2.116	7.012
		Lactobacillus pentosus UM054	8.888*	1.230	.000	6.440	11.336
		Lactobacillus pentosus YM122	3.862*	1.230	.002	1.414	6.310
		Lactobacillus pentosus VM096	7.186*	1.230	.000	4.738	9.634

	Lactobacillus pentosus VM095	14.210*	1.230	.000	11.762	16.658
	Lactococcus lactis A7	6.202*	1.230	.000	3.755	8.650
	Enterococcus faecalis YM126	1.766	1.230	.155	-.682	4.214
Lactobacillus pentosus VM095	*Lactobacillus pentosus* JM085	-6.103*	1.230	.000	-8.551	-3.655
	Lactobacillus pentosus JM0812	-6.654*	1.230	.000	-9.102	-4.206
	Lactobacillus pentosus UM055	-9.646*	1.230	.000	-12.094	-7.198
	Lactobacillus pentosus UM054	-5.322*	1.230	.000	-7.770	-2.874
	Lactobacillus pentosus YM122	-10.348*	1.230	.000	-12.796	-7.900
	Lactobacillus pentosus VM096	-7.024*	1.230	.000	-9.472	-4.576

		Lactobacillus pentosus DM068	-14.210*	1.230	.000	-16.658	-11.762
		Lactococcus lactis A7	-8.008*	1.230	.000	-10.456	-5.560
		Enterococcus faecalis YM126	-12.444*	1.230	.000	-14.892	-9.996
	Lactococcus lactis A7	*Lactobacillus pentosus* JM085	1.905	1.230	.125	-.543	4.353
		Lactobacillus pentosus JM0812	1.354	1.230	.274	-1.094	3.802
		Lactobacillus pentosus UM055	-1.638	1.230	.187	-4.086	.810
		Lactobacillus pentosus UM054	2.686*	1.230	.032	.238	5.134
		Lactobacillus pentosus YM122	-2.340	1.230	.061	-4.788	.108
		Lactobacillus pentosus VM096	.984	1.230	.426	-1.464	3.431

		Lactobacillus pentosus DM068	-6.202*	1.230	.000	-8.650	-3.755
		Lactobacillus pentosus VM095	8.008*	1.230	.000	5.560	10.456
		Enterococcus faecalis YM126	-4.436*	1.230	.001	-6.884	-1.988
	Enterococcus faecalis YM126	*Lactobacillus pentosus* JM085	6.341*	1.230	.000	3.893	8.789
		Lactobacillus pentosus JM0812	5.790*	1.230	.000	3.342	8.238
		Lactobacillus pentosus UM055	2.798*	1.230	.026	.350	5.246
		Lactobacillus pentosus UM054	7.122*	1.230	.000	4.674	9.570
		Lactobacillus pentosus YM122	2.096	1.230	.092	-.352	4.544
		Lactobacillus pentosus VM096	5.420*	1.230	.000	2.972	7.868

		Lactobacillus pentosus DM068	-1.766	1.230	.155	-4.214	.682
		Lactobacillus pentosus VM095	12.444*	1.230	.000	9.996	14.892
		Lactococcus lactis A7	4.436*	1.230	.001	1.988	6.884
FRAP	*Lactobacillus pentosus* JM085	*Lactobacillus pentosus* JM0812	-.087	1.384	.950	-2.842	2.667
		Lactobacillus pentosus UM055	-2.645	1.384	.060	-5.400	.109
		Lactobacillus pentosus UM054	.097	1.384	.944	-2.658	2.851
		Lactobacillus pentosus YM122	-8.333E-9	1.384	1.000	-2.755	2.755
		Lactobacillus pentosus VM096	-1.463	1.384	.294	-4.218	1.291
		Lactobacillus pentosus DM068	-3.227*	1.384	.022	-5.981	-.472

		Lactobacillus pentosus VM095	-12.519*	1.384	.000	-15.274	-9.765
		Lactococcus lactis A7	-.010	1.384	.994	-2.764	2.745
		Enterococcus faecalis YM126	-7.965*	1.384	.000	-10.720	-5.211
	Lactobacillus pentosus JM0812	*Lactobacillus pentosus* JM085	.087	1.384	.950	-2.667	2.842
		Lactobacillus pentosus UM055	-2.558	1.384	.068	-5.313	.196
		Lactobacillus pentosus UM054	.184	1.384	.895	-2.570	2.939
		Lactobacillus pentosus YM122	.087	1.384	.950	-2.667	2.842
		Lactobacillus pentosus VM096	-1.376	1.384	.323	-4.130	1.379
		Lactobacillus pentosus DM068	-3.140*	1.384	.026	-5.894	-.385

		Lactobacillus pentosus VM095	-12.432*	1.384	.000	-15.187	-9.678
		Lactococcus lactis A7	.078	1.384	.955	-2.677	2.832
		Enterococcus faecalis YM126	-7.878*	1.384	.000	-10.632	-5.123
	Lactobacillus pentosus UM055	*Lactobacillus pentosus* JM085	2.645	1.384	.060	-.109	5.400
		Lactobacillus pentosus JM0812	2.558	1.384	.068	-.196	5.313
		Lactobacillus pentosus UM054	2.742	1.384	.051	-.012	5.497
		Lactobacillus pentosus YM122	2.645	1.384	.060	-.109	5.400
		Lactobacillus pentosus VM096	1.182	1.384	.396	-1.572	3.937
		Lactobacillus pentosus DM068	-.581	1.384	.676	-3.336	2.173

		Lactobacillus pentosus VM095	-9.874*	1.384	.000	-12.629	-7.120
		Lactococcus lactis A7	2.636	1.384	.060	-.119	5.390
		Enterococcus faecalis YM126	-5.320*	1.384	.000	-8.074	-2.565
	Lactobacillus pentosus UM054	*Lactobacillus pentosus* JM085	-.097	1.384	.944	-2.851	2.658
		Lactobacillus pentosus JM0812	-.184	1.384	.895	-2.939	2.570
		Lactobacillus pentosus UM055	-2.742	1.384	.051	-5.497	.012
		Lactobacillus pentosus YM122	-.097	1.384	.944	-2.851	2.658
		Lactobacillus pentosus VM096	-1.560	1.384	.263	-4.315	1.194
		Lactobacillus pentosus DM068	-3.324*	1.384	.019	-6.078	-.569

		Lactobacillus pentosus VM095	-12.616*	1.384	.000	-15.371	-9.862
		Lactococcus lactis A7	-.107	1.384	.939	-2.861	2.648
		Enterococcus faecalis YM126	-8.062*	1.384	.000	-10.817	-5.308
	Lactobacillus pentosus YM122	*Lactobacillus pentosus* JM085	8.333E-9	1.384	1.000	-2.755	2.755
		Lactobacillus pentosus JM0812	-.087	1.384	.950	-2.842	2.667
		Lactobacillus pentosus UM055	-2.645	1.384	.060	-5.400	.109
		Lactobacillus pentosus UM054	.097	1.384	.944	-2.658	2.851
		Lactobacillus pentosus VM096	-1.463	1.384	.294	-4.218	1.291
		Lactobacillus pentosus DM068	-3.227*	1.384	.022	-5.981	-.472

		Lactobacillus pentosus VM095	-12.519*	1.384	.000	-15.274	-9.765
		Lactococcus lactis A7	-.010	1.384	.994	-2.764	2.745
		Enterococcus faecalis YM126	-7.965*	1.384	.000	-10.720	-5.211
	Lactobacillus pentosus VM096	*Lactobacillus pentosus* JM085	1.463	1.384	.294	-1.291	4.218
		Lactobacillus pentosus JM0812	1.376	1.384	.323	-1.379	4.130
		Lactobacillus pentosus UM055	-1.182	1.384	.396	-3.937	1.572
		Lactobacillus pentosus UM054	1.560	1.384	.263	-1.194	4.315
		Lactobacillus pentosus YM122	1.463	1.384	.294	-1.291	4.218
		Lactobacillus pentosus DM068	-1.764	1.384	.206	-4.518	.991

	Lactobacillus pentosus VM095	-11.056*	1.384	.000	-13.811	-8.302
	Lactococcus lactis A7	1.453	1.384	.297	-1.301	4.208
	Enterococcus faecalis YM126	-6.502*	1.384	.000	-9.256	-3.747
Lactobacillus pentosus DM068	*Lactobacillus pentosus* JM085	3.227*	1.384	.022	.472	5.981
	Lactobacillus pentosus JM0812	3.140*	1.384	.026	.385	5.894
	Lactobacillus pentosus UM055	.581	1.384	.676	-2.173	3.336
	Lactobacillus pentosus UM054	3.324*	1.384	.019	.569	6.078
	Lactobacillus pentosus YM122	3.227*	1.384	.022	.472	5.981
	Lactobacillus pentosus VM096	1.764	1.384	.206	-.991	4.518

		Lactobacillus pentosus VM095	-9.293*	1.384	.000	-12.047	-6.538
		Lactococcus lactis A7	3.217*	1.384	.023	.463	5.972
		Enterococcus faecalis YM126	-4.738*	1.384	.001	-7.493	-1.984
	Lactobacillus pentosus VM095	*Lactobacillus pentosus* JM085	12.519*	1.384	.000	9.765	15.274
		Lactobacillus pentosus JM0812	12.432*	1.384	.000	9.678	15.187
		Lactobacillus pentosus UM055	9.874*	1.384	.000	7.120	12.629
		Lactobacillus pentosus UM054	12.616*	1.384	.000	9.862	15.371
		Lactobacillus pentosus YM122	12.519*	1.384	.000	9.765	15.274
		Lactobacillus pentosus VM096	11.056*	1.384	.000	8.302	13.811

		Lactobacillus pentosus DM068	9.293*	1.384	.000	6.538	12.047
		Lactococcus lactis A7	12.510*	1.384	.000	9.755	15.264
		Enterococcus faecalis YM126	4.554*	1.384	.001	1.800	7.309
	Lactococcus lactis A7	*Lactobacillus pentosus* JM085	.010	1.384	.994	-2.745	2.764
		Lactobacillus pentosus JM0812	-.078	1.384	.955	-2.832	2.677
		Lactobacillus pentosus UM055	-2.636	1.384	.060	-5.390	.119
		Lactobacillus pentosus UM054	.107	1.384	.939	-2.648	2.861
		Lactobacillus pentosus YM122	.010	1.384	.994	-2.745	2.764
		Lactobacillus pentosus VM096	-1.453	1.384	.297	-4.208	1.301

		Lactobacillus pentosus DM068	-3.217*	1.384	.023	-5.972	-.463
		Lactobacillus pentosus VM095	-12.510*	1.384	.000	-15.264	-9.755
		Enterococcus faecalis YM126	-7.955*	1.384	.000	-10.710	-5.201
	Enterococcus faecalis YM126	*Lactobacillus pentosus* JM085	7.965*	1.384	.000	5.211	10.720
		Lactobacillus pentosus JM0812	7.878*	1.384	.000	5.123	10.632
		Lactobacillus pentosus UM055	5.320*	1.384	.000	2.565	8.074
		Lactobacillus pentosus UM054	8.062*	1.384	.000	5.308	10.817
		Lactobacillus pentosus YM122	7.965*	1.384	.000	5.211	10.720
		Lactobacillus pentosus VM096	6.502*	1.384	.000	3.747	9.256

		Lactobacillus pentosus DM068	4.738*	1.384	.001	1.984	7.493
		Lactobacillus pentosus VM095	-4.554*	1.384	.001	-7.309	-1.800
		Lactococcus lactis A7	7.955*	1.384	.000	5.201	10.710
TFC	*Lactobacillus pentosus* JM085	*Lactobacillus pentosus* JM0812	33.750*	4.643	.000	24.511	42.989
		Lactobacillus pentosus UM055	21.750*	4.643	.000	12.511	30.989
		Lactobacillus pentosus UM054	21.083*	4.643	.000	11.844	30.322
		Lactobacillus pentosus YM122	19.083*	4.643	.000	9.844	28.322
		Lactobacillus pentosus VM096	29.167*	4.643	.000	19.928	38.406
		Lactobacillus pentosus DM068	32.417*	4.643	.000	23.178	41.656

		Lactobacillus pentosus VM095	19.250*	4.643	.000	10.011	28.489
		Lactococcus lactis A7	17.250*	4.643	.000	8.011	26.489
		Enterococcus faecalis YM126	3.417	4.643	.464	-5.822	12.656
	Lactobacillus pentosus JM0812	*Lactobacillus pentosus* JM085	-33.750*	4.643	.000	-42.989	-24.511
		Lactobacillus pentosus UM055	-12.000*	4.643	.012	-21.239	-2.761
		Lactobacillus pentosus UM054	-12.667*	4.643	.008	-21.906	-3.428
		Lactobacillus pentosus YM122	-14.667*	4.643	.002	-23.906	-5.428
		Lactobacillus pentosus VM096	-4.583	4.643	.327	-13.822	4.656
		Lactobacillus pentosus DM068	-1.333	4.643	.775	-10.572	7.906

		Lactobacillus pentosus VM095	-14.500*	4.643	.002	-23.739	-5.261
		Lactococcus lactis A7	-16.500*	4.643	.001	-25.739	-7.261
		Enterococcus faecalis YM126	-30.333*	4.643	.000	-39.572	-21.094
	Lactobacillus pentosus UM055	*Lactobacillus pentosus* JM085	-21.750*	4.643	.000	-30.989	-12.511
		Lactobacillus pentosus JM0812	12.000*	4.643	.012	2.761	21.239
		Lactobacillus pentosus UM054	-.667	4.643	.886	-9.906	8.572
		Lactobacillus pentosus YM122	-2.667	4.643	.567	-11.906	6.572
		Lactobacillus pentosus VM096	7.417	4.643	.114	-1.822	16.656
		Lactobacillus pentosus DM068	10.667*	4.643	.024	1.428	19.906

		Lactobacillus pentosus VM095	-2.500	4.643	.592	-11.739	6.739
		Lactococcus lactis A7	-4.500	4.643	.335	-13.739	4.739
		Enterococcus faecalis YM126	-18.333*	4.643	.000	-27.572	-9.094
	Lactobacillus pentosus UM054	*Lactobacillus pentosus* JM085	-21.083*	4.643	.000	-30.322	-11.844
		Lactobacillus pentosus JM0812	12.667*	4.643	.008	3.428	21.906
		Lactobacillus pentosus UM055	.667	4.643	.886	-8.572	9.906
		Lactobacillus pentosus YM122	-2.000	4.643	.668	-11.239	7.239
		Lactobacillus pentosus VM096	8.083	4.643	.086	-1.156	17.322
		Lactobacillus pentosus DM068	11.333*	4.643	.017	2.094	20.572

		Lactobacillus pentosus VM095	-1.833	4.643	.694	-11.072	7.406
		Lactococcus lactis A7	-3.833	4.643	.411	-13.072	5.406
		Enterococcus faecalis YM126	-17.667*	4.643	.000	-26.906	-8.428
	Lactobacillus pentosus YM122	*Lactobacillus pentosus* JM085	-19.083*	4.643	.000	-28.322	-9.844
		Lactobacillus pentosus JM0812	14.667*	4.643	.002	5.428	23.906
		Lactobacillus pentosus UM055	2.667	4.643	.567	-6.572	11.906
		Lactobacillus pentosus UM054	2.000	4.643	.668	-7.239	11.239
		Lactobacillus pentosus VM096	10.083*	4.643	.033	.844	19.322
		Lactobacillus pentosus DM068	13.333*	4.643	.005	4.094	22.572

		Lactobacillus pentosus VM095	.167	4.643	.971	-9.072	9.406
		Lactococcus lactis A7	-1.833	4.643	.694	-11.072	7.406
		Enterococcus faecalis YM126	-15.667*	4.643	.001	-24.906	-6.428
	Lactobacillus pentosus VM096	*Lactobacillus pentosus* JM085	-29.167*	4.643	.000	-38.406	-19.928
		Lactobacillus pentosus JM0812	4.583	4.643	.327	-4.656	13.822
		Lactobacillus pentosus UM055	-7.417	4.643	.114	-16.656	1.822
		Lactobacillus pentosus UM054	-8.083	4.643	.086	-17.322	1.156
		Lactobacillus pentosus YM122	-10.083*	4.643	.033	-19.322	-.844
		Lactobacillus pentosus DM068	3.250	4.643	.486	-5.989	12.489

		Lactobacillus pentosus VM095	-9.917*	4.643	.036	-19.156	-.678
		Lactococcus lactis A7	-11.917*	4.643	.012	-21.156	-2.678
		Enterococcus faecalis YM126	-25.750*	4.643	.000	-34.989	-16.511
	Lactobacillus pentosus DM068	*Lactobacillus pentosus* JM085	-32.417*	4.643	.000	-41.656	-23.178
		Lactobacillus pentosus JM0812	1.333	4.643	.775	-7.906	10.572
		Lactobacillus pentosus UM055	-10.667*	4.643	.024	-19.906	-1.428
		Lactobacillus pentosus UM054	-11.333*	4.643	.017	-20.572	-2.094
		Lactobacillus pentosus YM122	-13.333*	4.643	.005	-22.572	-4.094
		Lactobacillus pentosus VM096	-3.250	4.643	.486	-12.489	5.989

		Lactobacillus pentosus VM095	-13.167*	4.643	.006	-22.406	-3.928
		Lactococcus lactis A7	-15.167*	4.643	.002	-24.406	-5.928
		Enterococcus faecalis YM126	-29.000*	4.643	.000	-38.239	-19.761
	Lactobacillus pentosus VM095	*Lactobacillus pentosus* JM085	-19.250*	4.643	.000	-28.489	-10.011
		Lactobacillus pentosus JM0812	14.500*	4.643	.002	5.261	23.739
		Lactobacillus pentosus UM055	2.500	4.643	.592	-6.739	11.739
		Lactobacillus pentosus UM054	1.833	4.643	.694	-7.406	11.072
		Lactobacillus pentosus YM122	-.167	4.643	.971	-9.406	9.072
		Lactobacillus pentosus VM096	9.917*	4.643	.036	.678	19.156

		Lactobacillus pentosus DM068	13.167*	4.643	.006	3.928	22.406
		Lactococcus lactis A7	-2.000	4.643	.668	-11.239	7.239
		Enterococcus faecalis YM126	-15.833*	4.643	.001	-25.072	-6.594
	Lactococcus lactis A7	*Lactobacillus pentosus* JM085	-17.250*	4.643	.000	-26.489	-8.011
		Lactobacillus pentosus JM0812	16.500*	4.643	.001	7.261	25.739
		Lactobacillus pentosus UM055	4.500	4.643	.335	-4.739	13.739
		Lactobacillus pentosus UM054	3.833	4.643	.411	-5.406	13.072
		Lactobacillus pentosus YM122	1.833	4.643	.694	-7.406	11.072
		Lactobacillus pentosus VM096	11.917*	4.643	.012	2.678	21.156

		Lactobacillus pentosus DM068	15.167*	4.643	.002	5.928	24.406
		Lactobacillus pentosus VM095	2.000	4.643	.668	-7.239	11.239
		Enterococcus faecalis YM126	-13.833*	4.643	.004	-23.072	-4.594
	Enterococcus faecalis YM126	*Lactobacillus pentosus* JM085	-3.417	4.643	.464	-12.656	5.822
		Lactobacillus pentosus JM0812	30.333*	4.643	.000	21.094	39.572
		Lactobacillus pentosus UM055	18.333*	4.643	.000	9.094	27.572
		Lactobacillus pentosus UM054	17.667*	4.643	.000	8.428	26.906
		Lactobacillus pentosus YM122	15.667*	4.643	.001	6.428	24.906
		Lactobacillus pentosus VM096	25.750*	4.643	.000	16.511	34.989

		Lactobacillus pentosus DM068	29.000*	4.643	.000	19.761	38.239
		Lactobacillus pentosus VM095	15.833*	4.643	.001	6.594	25.072
		Lactococcus lactis A7	13.833*	4.643	.004	4.594	23.072
TPC	*Lactobacillus pentosus* JM085	*Lactobacillus pentosus* JM0812	5.089	8.030	.528	-10.891	21.069
		Lactobacillus pentosus UM055	12.440	8.030	.125	-3.540	28.420
		Lactobacillus pentosus UM054	11.280	8.030	.164	-4.700	27.259
		Lactobacillus pentosus YM122	27.500*	8.030	.001	11.520	43.479
		Lactobacillus pentosus VM096	13.155	8.030	.105	-2.825	29.134
		Lactobacillus pentosus DM068	-14.554	8.030	.074	-30.534	1.426

	Lactobacillus pentosus VM095	18.006*	8.030	.028	2.026	33.986
	Lactococcus lactis A7	-8.170	8.030	.312	-24.150	7.810
	Enterococcus faecalis YM126	19.910*	8.030	.015	3.931	35.890
Lactobacillus pentosus JM0812	*Lactobacillus pentosus* JM085	-5.089	8.030	.528	-21.069	10.891
	Lactobacillus pentosus UM055	7.351	8.030	.363	-8.629	23.331
	Lactobacillus pentosus UM054	6.190	8.030	.443	-9.789	22.170
	Lactobacillus pentosus YM122	22.410*	8.030	.007	6.431	38.390
	Lactobacillus pentosus VM096	8.065	8.030	.318	-7.914	24.045
	Lactobacillus pentosus DM068	-19.643*	8.030	.017	-35.623	-3.663

		Lactobacillus pentosus VM095	12.917	8.030	.112	-3.063	28.896
		Lactococcus lactis A7	-13.259	8.030	.103	-29.239	2.721
		Enterococcus faecalis YM126	14.821	8.030	.069	-1.159	30.801
	Lactobacillus pentosus UM055	*Lactobacillus pentosus* JM085	-12.440	8.030	.125	-28.420	3.540
		Lactobacillus pentosus JM0812	-7.351	8.030	.363	-23.331	8.629
		Lactobacillus pentosus UM054	-1.161	8.030	.885	-17.140	14.819
		Lactobacillus pentosus YM122	15.059	8.030	.064	-.920	31.039
		Lactobacillus pentosus VM096	.714	8.030	.929	-15.265	16.694
		Lactobacillus pentosus DM068	-26.994*	8.030	.001	-42.974	-11.014

		Lactobacillus pentosus VM095	5.566	8.030	.490	-10.414	21.545
		Lactococcus lactis A7	-20.610*	8.030	.012	-36.590	-4.630
		Enterococcus faecalis YM126	7.470	8.030	.355	-8.510	23.450
	Lactobacillus pentosus UM054	*Lactobacillus pentosus* JM085	-11.280	8.030	.164	-27.259	4.700
		Lactobacillus pentosus JM0812	-6.190	8.030	.443	-22.170	9.789
		Lactobacillus pentosus UM055	1.161	8.030	.885	-14.819	17.140
		Lactobacillus pentosus YM122	16.220*	8.030	.047	.240	32.200
		Lactobacillus pentosus VM096	1.875	8.030	.816	-14.105	17.855
		Lactobacillus pentosus DM068	-25.834*	8.030	.002	-41.813	-9.854

		Lactobacillus pentosus VM095	6.726	8.030	.405	-9.254	22.706
		Lactococcus lactis A7	-19.450*	8.030	.018	-35.429	-3.470
		Enterococcus faecalis YM126	8.631	8.030	.286	-7.349	24.611
	Lactobacillus pentosus YM122	*Lactobacillus pentosus* JM085	-27.500*	8.030	.001	-43.479	-11.520
		Lactobacillus pentosus JM0812	-22.410*	8.030	.007	-38.390	-6.431
		Lactobacillus pentosus UM055	-15.059	8.030	.064	-31.039	.920
		Lactobacillus pentosus UM054	-16.220*	8.030	.047	-32.200	-.240
		Lactobacillus pentosus VM096	-14.345	8.030	.078	-30.325	1.635
		Lactobacillus pentosus DM068	-42.054*	8.030	.000	-58.033	-26.074

		Lactobacillus pentosus VM095	-9.494	8.030	.241	-25.474	6.486
		Lactococcus lactis A7	-35.670*	8.030	.000	-51.649	-19.690
		Enterococcus faecalis YM126	-7.589	8.030	.347	-23.569	8.391
	Lactobacillus pentosus VM096	*Lactobacillus pentosus* JM085	-13.155	8.030	.105	-29.134	2.825
		Lactobacillus pentosus JM0812	-8.065	8.030	.318	-24.045	7.914
		Lactobacillus pentosus UM055	-.714	8.030	.929	-16.694	15.265
		Lactobacillus pentosus UM054	-1.875	8.030	.816	-17.855	14.105
		Lactobacillus pentosus YM122	14.345	8.030	.078	-1.635	30.325
		Lactobacillus pentosus DM068	-27.708*	8.030	.001	-43.688	-11.729

	Lactobacillus pentosus VM095	4.851	8.030	.547	-11.129	20.831
	Lactococcus lactis A7	-21.325*	8.030	.010	-37.304	-5.345
	Enterococcus faecalis YM126	6.756	8.030	.403	-9.224	22.736
Lactobacillus pentosus DM068	*Lactobacillus pentosus* JM085	14.554	8.030	.074	-1.426	30.534
	Lactobacillus pentosus JM0812	19.643*	8.030	.017	3.663	35.623
	Lactobacillus pentosus UM055	26.994*	8.030	.001	11.014	42.974
	Lactobacillus pentosus UM054	25.834*	8.030	.002	9.854	41.813
	Lactobacillus pentosus YM122	42.054*	8.030	.000	26.074	58.033
	Lactobacillus pentosus VM096	27.708*	8.030	.001	11.729	43.688

	Lactobacillus pentosus VM095	32.560*	8.030	.000	16.580	48.539
	Lactococcus lactis A7	6.384	8.030	.429	-9.596	22.364
	Enterococcus faecalis YM126	34.464*	8.030	.000	18.485	50.444
Lactobacillus pentosus VM095	*Lactobacillus pentosus* JM085	-18.006*	8.030	.028	-33.986	-2.026
	Lactobacillus pentosus JM0812	-12.917	8.030	.112	-28.896	3.063
	Lactobacillus pentosus UM055	-5.566	8.030	.490	-21.545	10.414
	Lactobacillus pentosus UM054	-6.726	8.030	.405	-22.706	9.254
	Lactobacillus pentosus YM122	9.494	8.030	.241	-6.486	25.474
	Lactobacillus pentosus VM096	-4.851	8.030	.547	-20.831	11.129

	Lactobacillus pentosus DM068	-32.560*	8.030	.000	-48.539	-16.580
	Lactococcus lactis A7	-26.176*	8.030	.002	-42.156	-10.196
	Enterococcus faecalis YM126	1.905	8.030	.813	-14.075	17.884
Lactococcus lactis A7	*Lactobacillus pentosus* JM085	8.170	8.030	.312	-7.810	24.150
	Lactobacillus pentosus JM0812	13.259	8.030	.103	-2.721	29.239
	Lactobacillus pentosus UM055	20.610*	8.030	.012	4.630	36.590
	Lactobacillus pentosus UM054	19.450*	8.030	.018	3.470	35.429
	Lactobacillus pentosus YM122	35.670*	8.030	.000	19.690	51.649
	Lactobacillus pentosus VM096	21.325*	8.030	.010	5.345	37.304

		Lactobacillus pentosus DM068	-6.384	8.030	.429	-22.364	9.596
		Lactobacillus pentosus VM095	26.176*	8.030	.002	10.196	42.156
		Enterococcus faecalis YM126	28.080*	8.030	.001	12.101	44.060
	Enterococcus faecalis YM126	*Lactobacillus pentosus* JM085	-19.910*	8.030	.015	-35.890	-3.931
		Lactobacillus pentosus JM0812	-14.821	8.030	.069	-30.801	1.159
		Lactobacillus pentosus UM055	-7.470	8.030	.355	-23.450	8.510
		Lactobacillus pentosus UM054	-8.631	8.030	.286	-24.611	7.349
		Lactobacillus pentosus YM122	7.589	8.030	.347	-8.391	23.569
		Lactobacillus pentosus VM096	-6.756	8.030	.403	-22.736	9.224

	Lactobacillus pentosus DM068	-34.464*	8.030	.000	-50.444	-18.485
	Lactobacillus pentosus VM095	-1.905	8.030	.813	-17.884	14.075
	Lactococcus lactis A7	-28.080*	8.030	.001	-44.060	-12.101

Based on estimated marginal means

a. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

*. The mean difference is significant at the .05 level.

ตารางที่ 11 Multivariate Tests ของของกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ สารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ (แบคทีเรียผลิตกรดแลคติก)

Multivariate Tests

	Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Pillai's trace	2.265	11.607	36.000	320.000	.000
Wilks' lambda	.028	12.918	36.000	290.292	.000
Hotelling's trace	6.369	13.358	36.000	302.000	.000
Roy's largest root	2.741	24.368[a]	9.000	80.000	.000

Each F tests the multivariate effect of MO. These tests are based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

a. The statistic is an upper bound on F that yields a lower bound on the significance level.

ตารางที่ 12 Univariate Tests ของกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ สารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ (แบคทีเรียผลิตกรดแลคติก)

Univariate Tests

Dependent Variable		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
DPPH	Contrast	1728.862	9	192.096	21.159	.000
	Error	726.294	80	9.079		
FRAP	Contrast	1948.221	9	216.469	18.832	.000
	Error	919.596	80	11.495		
TFC	Contrast	13376.033	9	1486.226	11.492	.000
	Error	10346.000	80	129.325		
TPC	Contrast	18236.421	9	2026.269	5.238	.000
	Error	30949.296	80	386.866		

The F tests the effect of MO. This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

ตารางที่ 13 Estimates ของกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ สารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ (ระยะเวลาในการหมัก)

Estimates

Dependent Variable	Time	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
DPPH	0 h	37.034	.550	35.939	38.129
	24 h	51.791	.550	50.696	52.886
	48 h	61.443	.550	60.348	62.538
	72 h	70.451	.550	69.357	71.546
FRAP	0 h	227.911	.619	226.679	229.143
	24 h	234.438	.619	233.206	235.670
	48 h	267.659	.619	266.427	268.891
	72 h	284.097	.619	282.865	285.329
TFC	0 h	58.800	2.076	54.668	62.932
	24 h	162.900	2.076	158.768	167.032
	48 h	179.000	2.076	174.868	183.132
	72 h	196.167	2.076	192.035	200.299
TPC	0 h	114.297	3.591	107.151	121.444
	24 h	256.899	3.591	249.752	264.045
	48 h	263.506	3.591	256.360	270.652
	72 h	276.006	3.591	268.860	283.152

ตารางที่ 14 Pairwise Comparisons ของกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ สารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ (ระยะเวลาในการหมัก)

Pairwise Comparisons

Dependent Variable	(I) Time	(J) Time	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.[a]	95% Confidence Interval for Difference[a]	
						Lower Bound	Upper Bound
DPPH	0 h	24 h	-14.757*	.778	.000	-16.305	-13.209
		48 h	-24.409*	.778	.000	-25.957	-22.861
		72 h	-33.417*	.778	.000	-34.966	-31.869
	24 h	0 h	14.757*	.778	.000	13.209	16.305
		48 h	-9.652*	.778	.000	-11.200	-8.104
		72 h	-18.660*	.778	.000	-20.209	-17.112
	48 h	0 h	24.409*	.778	.000	22.861	25.957
		24 h	9.652*	.778	.000	8.104	11.200
		72 h	-9.009*	.778	.000	-10.557	-7.460
	72 h	0 h	33.417*	.778	.000	31.869	34.966
		24 h	18.660*	.778	.000	17.112	20.209
		48 h	9.009*	.778	.000	7.460	10.557

FRAP	0 h	24 h	-6.527*	.875	.000	-8.269	-4.785
		48 h	-39.748*	.875	.000	-41.490	-38.006
		72 h	-56.186*	.875	.000	-57.928	-54.444
	24 h	0 h	6.527*	.875	.000	4.785	8.269
		48 h	-33.221*	.875	.000	-34.963	-31.479
		72 h	-49.659*	.875	.000	-51.401	-47.917
	48 h	0 h	39.748*	.875	.000	38.006	41.490
		24 h	33.221*	.875	.000	31.479	34.963
		72 h	-16.438*	.875	.000	-18.180	-14.696
	72 h	0 h	56.186*	.875	.000	54.444	57.928
		24 h	49.659*	.875	.000	47.917	51.401
		48 h	16.438*	.875	.000	14.696	18.180
TFC	0 h	24 h	-104.100*	2.936	.000	-109.943	-98.257
		48 h	-120.200*	2.936	.000	-126.043	-114.357
		72 h	-137.367*	2.936	.000	-143.210	-131.523
	24 h	0 h	104.100*	2.936	.000	98.257	109.943
		48 h	-16.100*	2.936	.000	-21.943	-10.257
		72 h	-33.267*	2.936	.000	-39.110	-27.423

	48 h	0 h	120.200*	2.936	.000	114.357	126.043
		24 h	16.100*	2.936	.000	10.257	21.943
		72 h	-17.167*	2.936	.000	-23.010	-11.323
	72 h	0 h	137.367*	2.936	.000	131.523	143.210
		24 h	33.267*	2.936	.000	27.423	39.110
		48 h	17.167*	2.936	.000	11.323	23.010
TPC	0 h	24 h	-142.601*	5.078	.000	-152.708	-132.495
		48 h	-149.208*	5.078	.000	-159.315	-139.102
		72 h	-161.708*	5.078	.000	-171.815	-151.602
	24 h	0 h	142.601*	5.078	.000	132.495	152.708
		48 h	-6.607	5.078	.197	-16.714	3.499
		72 h	-19.107*	5.078	.000	-29.214	-9.001
	48 h	0 h	149.208*	5.078	.000	139.102	159.315
		24 h	6.607	5.078	.197	-3.499	16.714
		72 h	-12.500*	5.078	.016	-22.607	-2.394
	72 h	0 h	161.708*	5.078	.000	151.602	171.815
		24 h	19.107*	5.078	.000	9.001	29.214
		48 h	12.500*	5.078	.016	2.394	22.607

Based on estimated marginal means

*. The mean difference is significant at the .05 level.

a. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

ตารางที่ 15 Multivariate Tests ของกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ สารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ (ระยะเวลาในการหมัก)

Multivariate Tests

	Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Pillai's trace	2.022	40.833	12.000	237.000	.000
Wilks' lambda	.000	326.469	12.000	204.014	.000
Hotelling's trace	161.989	1021.429	12.000	227.000	.000
Roy's largest root	145.089	2865.508[a]	4.000	79.000	.000

Each F tests the multivariate effect of Time. These tests are based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

a. The statistic is an upper bound on F that yields a lower bound on the significance level.

ตารางที่ 16 Univariate Tests ของกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ สารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ (ระยะเวลาในการหมัก)

Univariate Tests

Dependent Variable		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
DPPH	Contrast	18395.924	3	6131.975	675.426	.000
	Error	726.294	80	9.079		
FRAP	Contrast	64644.218	3	21548.073	1874.568	.000
	Error	919.596	80	11.495		
TFC	Contrast	343612.700	3	114537.567	885.657	.000
	Error	10346.000	80	129.325		
TPC	Contrast	519846.951	3	173282.317	447.913	.000
	Error	30949.296	80	386.866		

The F tests the effect of Time. This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

ตารางที่ 17 Duncan ของกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH (แบคทีเรียผลิตกรดแลคติก)

DPPH

Duncan

MO	N	Subset				
		1	2	3	4	5
Lactobacillus pentosus VM095	12	47.2039				
Lactobacillus pentosus UM054	12		52.5258			
Lactobacillus pentosus JM085	12		53.3068			
Lactobacillus pentosus JM0812	12		53.8576			
Lactobacillus pentosus VM096	12		54.2282			
Lactococcus lactis A7	12		55.2117	55.2117		
Lactobacillus pentosus UM055	12			56.8500		
Lactobacillus pentosus YM122	12			57.5520	57.5520	
Enterococcus faecalis YM126	12				59.6480	59.6480
Lactobacillus pentosus DM068	12					61.4142
Sig.		1.000	.053	.075	.092	.155

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square (Error) = 9.079.

ตารางที่ 18 Duncan ของกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี FRAP (แบคทีเรียผลิตกรดแลคติก)

FRAP

Duncan

MO	N	Subset 1	2	3	4
Lactobacillus pentosus UM054	12	250.6473			
Lactobacillus pentosus JM085	12	250.7442			
Lactobacillus pentosus YM122	12	250.7442			
Lactococcus lactis A7	12	250.7539			
Lactobacillus pentosus JM0812	12	250.8314			
Lactobacillus pentosus VM096	12	252.2074	252.2074		
Lactobacillus pentosus UM055	12	253.3895	253.3895		
Lactobacillus pentosus DM068	12		253.9709		
Enterococcus faecalis YM126	12			258.7093	
Lactobacillus pentosus VM095	12				263.2636
Sig.		.091	.234	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square (Error) = 11.495.

ตารางที่ 19 Duncan ของสารประกอบฟีนอลิก (แบคทีเรียผลิตกรดแลคติก)

TFC

Duncan

MO	N	Subset 1	2	3	4
Lactobacillus pentosus JM0812	12	135.1833			
Lactobacillus pentosus DM068	12	136.5167			
Lactobacillus pentosus VM096	12	139.7667	139.7667		
Lactobacillus pentosus UM055	12		147.1833	147.1833	
Lactobacillus pentosus UM054	12		147.8500	147.8500	
Lactobacillus pentosus VM095	12		149.6833	149.6833	
Lactobacillus pentosus YM122	12		149.8500	149.8500	
Lactococcus lactis A7	12			151.6833	
Enterococcus faecalis YM126	12				165.5167
Lactobacillus pentosus JM085	12				168.9333
Sig.		.357	.055	.397	.464

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square (Error) = 129.325.

ตารางที่ 20 Duncan ของสารฟลาโวนอยด์ (แบคทีเรียผลิตกรดแลคติก)

TPC

Duncan

MO	N	Subset 1	2	3	4	5
Lactobacillus pentosus YM122	12	208.6430				
Enterococcus faecalis YM126	12	216.2322	216.2322			
Lactobacillus pentosus VM095	12	218.1368	218.1368	218.1368		
Lactobacillus pentosus VM096	12	222.9881	222.9881	222.9881		
Lactobacillus pentosus UM055	12	223.7024	223.7024	223.7024		
Lactobacillus pentosus UM054	12	224.8630	224.8630	224.8630		
Lactobacillus pentosus JM0812	12		231.0534	231.0534	231.0534	
Lactobacillus pentosus JM085	12			236.1427	236.1427	236.1427
Lactococcus lactis A7	12				244.3126	244.3126
Lactobacillus pentosus DM068	12					250.6965
Sig.		.080	.110	.051	.123	.090

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square (Error) = 386.866.

ตารางที่ 21 Duncan ของกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH (ระยะเวลาในการหมัก)

DPPH

Duncan

Time	N	Subset			
		1	2	3	4
0 h	30	37.0341			
24 h	30		51.7910		
48 h	30			61.4428	
72 h	30				70.4514
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square (Error) = 9.079.

ตารางที่ 22 Duncan ของกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี FRAP (ระยะเวลาในการหมัก)

FRAP

Duncan

Time	N	Subset			
		1	2	3	4
0 h	30	227.9109			
24 h	30		234.4380		
48 h	30			267.6589	
72 h	30				284.0969
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square (Error) = 11.495.

ตารางที่ 23 Duncan ของสารประกอบฟีนอลิก (ระยะเวลาในการหมัก)

TFC

Duncan

Time	N	Subset			
		1	2	3	4
0 h	30	58.8000			
24 h	30		162.9000		
48 h	30			179.0000	
72 h	30				196.1667
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square (Error) = 129.325.

ตารางที่ 24 Duncan ของสารฟลาโวนอยด์ (ระยะเวลาในการหมัก)

TPC

Duncan

Time	N	Subset 1	Subset 2	Subset 3
0 h	30	114.2975		
24 h	30		256.8988	
48 h	30		263.5060	
72 h	30			276.0060
Sig.		1.000	.197	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square (Error) = 386.866.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาววันวิสาข์ บุญกล้า
วันเกิด	วันที่ 8 เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2533
สถานที่เกิด	จังหวัดร้อยเอ็ด ประเทศไทย
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 101 หมู่ที่ 11 ตำบลเหนือเมือง อำเภอเมือง จังหวัดร้อยเอ็ด
ตำแหน่งหน้าที่การงาน	เจ้าหน้าที่ทรัพย์สินทางปัญญา
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	หน่วยจัดการทรัพย์สินทางปัญญา ศูนย์ความร่วมมือกับภาคอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ตำบลขามเรียง อำเภอกันทรวิชัย จังหวัด มหาสารคาม 44150
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2551 มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนสตรีศึกษาร้อยเอ็ด พ.ศ. 2556 ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม พ.ศ 2565 ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
ทุนวิจัย	ทุนอุดหนุนการวิจัยจากสานักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประเภทบัณฑิตศึกษาประจาปี 2562