

# การเพิ่มฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำปลูควาด้วยการผสม กับกระชายดำและหมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก

## Increase in Antioxidant Activity of *Plu-kae* Juice by Mixing It with *Krachaidum* and Fermenting by Lactic Acid Bacteria Starters

ทศพล พลคำมาก (Tossapol Polkummak)\* ดร.ธีระ ฤทธิรอด (Dr.Theera Rittirod)\*\*  
ดร.สิรินดา ยุ่นฉลาด (Dr.Sirinda Yunchalard)\*\*\*

### บทคัดย่อ

แนวทางหนึ่งในการเพิ่มฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำปลูควา คือการผสมปลูควากับกระชายดำและหมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก ทำได้โดยเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระหลังจากหมัก 30 วัน ที่ใช้น้ำปลูควาอย่างเดียว และที่ใช้น้ำปลูควาผสมกับกระชายดำ 260 หรือ 520 g และเติมน้ำตาลอ้อย ด้วยวิธี FRAP การหมักชุดแรกทำโดยใช้สภาวะทั้งที่มี และไม่มีการเติมน้ำตาลอ้อย และแบคทีเรียกรดแลคติก รวมทั้งที่มี และไม่มีการเติมน้ำตาลอ้อย การหมักชุดหลังทำโดยใช้สภาวะทั้งที่มีหรือไม่มีการเติมน้ำตาลอ้อย ผลที่ได้จากการหมักน้ำปลูควาอย่างเดียว ที่มีทั้งการเติมน้ำตาลอ้อย และผลจากการหมักน้ำปลูควาที่มีการเติมกระชายดำ 520 g กล้าเชื้อ และน้ำตาลอ้อย มีกรดแลคติก 8.02; 16.17 g/l กรดอะซิติก 16.03; 4.06 g/l pH 3.43; 3.40 ปริมาณกรดทั้งหมด 11.59; 13.98 g/l น้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ 0.59; 5.7 g/l และจำนวนนับของแบคทีเรียกรดแลคติก  $8.2 \times 10^9$ ;  $7.1 \times 10^8$  CFU/ml ตามลำดับ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากทั้งสองกระบวนการหมักคือ 271.57 และ 891.0  $\mu\text{mol/l}$  ตามลำดับ ซึ่งพบว่าสูงกว่า 78.71  $\mu\text{mol/l}$  ที่ได้จากการหมักที่ใช้น้ำปลูควาเพียงอย่างเดียว ดังนั้น การเติมทั้งกล้าเชื้อ และน้ำตาลอ้อยได้เพิ่มฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำปลูความากกว่า 3.5 เท่า และเพิ่มขึ้นมากกว่า 11.3 เท่า เมื่อมีการผสมกระชายดำ 520 g เติมน้ำตาลอ้อยก่อนหมัก

### ABSTRACT

One approach to increase antioxidant activity of *plu-kae* juice is to mix it with *krachaidum* and ferment with lactic acid bacteria. This was done by comparison between antioxidant activities after 30 days of fermentations using *plu-kae* juice only and using *plu-kae* juice mixing with either 260 or 520 g of *krachaidum* and with cane sugar by the FRAP method. The former fermentations were conducted by the conditions when with and without lactic acid bacteria starters including with or without cane sugar was added. The

<sup>1</sup> Correspondent author: Sirinda@kku.ac.th

\* นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น

\*\* รองศาสตราจารย์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

\*\*\* รองศาสตราจารย์ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น

latter fermentations were carried out by the conditions in which with or without starters was added. Results obtained from the fermentation of *plu-kao* juice only in which starters and cane sugar had been added and from the fermentation of *plu-kao* juice with the addition of 520 g of *krachaidum*, starters, and cane sugar were lactic acid 8.02; 16.17g/l, acetic acid 16.03; 4.06 g/l, pH 3.43; 3.40, total acidity 11.59; 13.98 g/l, total residual sugar 0.59; 5.7 g/l, and lactic acid bacteria count  $8.2 \times 10^9$ ;  $7.1 \times 10^8$  CFU/ml, respectively. The antioxidant activities gained from these two fermentation processes as 271.57 and 891.0  $\mu\text{mol/l}$ , respectively were found to be higher than 78.71  $\mu\text{mol/l}$  obtained from fermentation of *plu-kao* juice only. Therefore, *plu-kao* juice fermentation with addition of both starters and cane sugar had increased its antioxidant activity by more than 3.5 times and had been boosted to 11.3 times when it was mixed with 520 g of *krachaidum*, the starters and cane sugar before fermentation.

**คำสำคัญ:** พลูควา แบคทีเรียกรดแลคติก ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

**Keywords:** *plu-kao*, Lactic acid bacteria, Antioxidant activity

## บทนำ

ปัจจุบันผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพในรูปแบบต่าง ๆ เป็นที่สนใจของผู้บริโภคในกลุ่มรักสุขภาพ จึงทำให้มีการแปรรูปผลิตภัณฑ์อย่างหลากหลาย โดยเฉพาะในรูปแบบเครื่องดื่มสมุนไพรเพื่อสุขภาพ รวมทั้งเครื่องดื่มพลูควา ซึ่งพลูควา (*plu-kao*) เป็นพืชสมุนไพรพื้นเมืองที่รู้จักกันดีทางภาคเหนือของประเทศไทย มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Houttuynia cordata* Thunb. (วงศ์ Saururaceae) พบได้ทั่วไปในประเทศต่างๆ ของทวีปเอเชีย ได้แก่ จีน ญี่ปุ่น เกาหลี เวียดนาม กัมพูชา ลาว และพม่า เป็นต้น มีชื่อเรียกอื่นๆ ได้แก่ ผักพลูควา ผักคาวตอง ผักก้านตอง ที่เรียกชื่อขึ้นต้นว่า “ผัก” แสดงถึงการนำไปใช้ประโยชน์ด้วยการใช้เป็นผักเครื่องเคียง และที่ชื่อมีคำว่า “พลู” บ่งบอกถึงการเป็นพืชที่มีใบที่มีรูปร่างคล้ายหัวใจเหมือนใบพลู และคำว่า “ควา” เป็นการบ่งบอกว่าเป็นพืชมีกลิ่นคาว [1] พลูความีสารออกฤทธิ์หลายชนิด เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ต้านเนื้องอก (antitumor) และ ต้านเซลล์มะเร็ง (anti-cancer) ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) ต้านไวรัส (antiviral activity) และต้าน

จุลินทรีย์ (antimicrobial agent) [2-3] นอกจากนี้ในปี ค.ศ.2008 Lau และคณะ [4] ได้รายงานว่ พลูความีส่วนช่วยในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันให้สูงขึ้นทำให้สามารถป้องกันโรคทางเดินหายใจเฉียบพลันรุนแรง (Acute Respiratory Syndrome; SARS) ซึ่งสอดคล้องกับปี พ.ศ. 2552 ที่กระทรวงสาธารณสุขของประเทศไทยได้ประกาศให้พลูควาเป็น หนึ่งในพืชสมุนไพรที่ช่วยป้องกันไข้หวัดดังกล่าวได้ โดย Cai และคณะ [5] ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ของพืชสมุนไพรจากจีนกว่า 100 ชนิด รวมถึง พลูควา พบว่า สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) และกรดฟีนอลิก (phenolic acids) ชนิดต่างๆที่พบในสมุนไพรเหล่านี้สามารถต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มที่เป็น Reactive Oxygen Species (ROS) ได้แก่ superoxide ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) peroxide ( $\text{ROO}^{\cdot}$ ) hydroxyl ( $\text{HO}^{\cdot}$ ) และ nitric oxide ( $\text{NO}^{\cdot}$ ) [6] เนื่องจากอนุมูลอิสระเป็นสาเหตุในการทำให้เกิดผลเสียต่อสุขภาพในด้านต่างๆ อาทิ การเสื่อมโทรมของเซลล์และเนื้อเยื่อ การเกิดเนื้องอกและเซลล์มะเร็ง ดังนั้น เมื่อมีการบริโภคผลิตภัณฑ์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอนุมูลอิสระ

ในร่างกายของผู้บริโภคจะถูกทำลายไป ส่งผลให้เกิดการป้องกันการเกิดผลเสียทางสุขภาพต่าง ๆ ดังกล่าวได้ [7] โดยปัจจุบันผลิตภัณฑ์พลูควาที่มีในท้องตลาดจะอยู่ในรูปแบบของเครื่องดื่มน้ำสมุนไพรสกัดจากพลูควาที่ใช้พลูควาเพียงอย่างเดียวเท่านั้นยังไม่ได้มีการผสมสมุนไพรชนิดอื่น น้ำสกัดพลูความีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 231.16  $\mu\text{mol trolox/l}$  จากการวัดด้วยวิธี TEAC [8] และ 375.90  $\mu\text{mol trolox/g extract}$  จากการวัดด้วยวิธี FRAP [9] การศึกษาครั้งนี้จึงได้หาแนวทางในการเพิ่มคุณค่าเพื่อเสริมสุขภาพของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มน้ำสมุนไพรพลูควาให้สูงขึ้นโดยผสมกับกระชายดำจากนั้นจึงนำมาหมักกับแบคทีเรียกรดแลคติก การผสมกับสมุนไพรชนิดอื่นเพื่อให้มีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้นกว่าการใช้สมุนไพรพลูควาเพียงชนิดเดียวเป็นแนวทางการใช้สมุนไพรร่วมกันเพื่อการเสริมฤทธิ์ซึ่งกันและกัน ซึ่งในทางเภสัชกรรมเรียกว่าการเกิดปฏิสัมพันธ์แบบเสริมกัน หรือ synergistic interaction ตามรูปแบบของการใช้สมุนไพรผสมนานาชนิดในตำรับยาหม้อมาตั้งแต่สมัยบรรพบุรุษ ในปัจจุบันพบว่ามีกรรณกระชายดำ (*Krachaidum*) ซึ่งมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Kaempferia parviflora* Wall. Ex Baker (วงศ์ Zingiberaceae) [10] มาใช้ผสมในการผลิตไวน์พื้นบ้านกันมาก โดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เพื่อหวังผลเชิงบวกทางด้านสุขภาพ [11] จากงานวิจัยของ Nanasombat และคณะ [12] พบว่าในกระชายดำ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 126.47  $\mu\text{mol FeSO}_4/\text{g extract}$  ดังนั้นกระชายดำจึงเป็นสมุนไพรที่น่าสนใจอีกชนิดหนึ่งที่จะนำมาทดลองใช้ผสมกับพลูควา นอกจากนี้แล้วยังมีรายงานเกี่ยวกับการเพิ่มประโยชน์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบในพืชด้วยการใช้กระบวนการแปรรูปที่เป็นกระบวนการหมักกับแบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria) กับน้ำลูกยอ [13] แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นกลุ่มแบคทีเรียกลุ่มใหญ่ที่นอกจากจะเป็นที่รู้จักกันทั่วไปว่าปลอดภัย (Generally Recognized As Safe, GRAS) เพราะ

มีความเกี่ยวข้องกับการแปรรูปอาหารเป็นอาหารหมักต้องเป็นเวลานาน แล้วยังเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่รู้จักกันดีอีกด้วยว่าเป็นแบคทีเรียกลุ่มที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ หรือที่เรียกว่า โปรไบโอติก (probiotic) โดยสามารถเร่งให้เกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเหล่านี้ให้เพิ่มมากขึ้น หรือที่เรียกว่า biotransformation [14] การเพิ่มฤทธิ์ทางชีวภาพ ในน้ำหมักสมุนไพรพลูควาโดยผสมกับกระชายดำและหมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกนี้ จึงเป็นหนึ่งในแนวทางของการเพิ่มผลดีต่อสุขภาพให้ผู้บริโภคผลิตภัณฑ์น้ำพลูควาและยังทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ใหม่อีกด้วย

## วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของกรดอินทรีย์ที่เกิดจากการหมักพลูควาด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ
2. เพื่อเพิ่มฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในน้ำหมักพลูควาให้สูงขึ้นโดยการเติมกระชายดำในปริมาณที่เหมาะสม

## อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. จุลินทรีย์ และวัตถุดิบ  
กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ผสมที่มีจำนวนเริ่มต้นที่  $3.2 \times 10^4$  CFU/ml พลูควาสด กระชายดำสด น้ำตาลอ้อย และน้ำ Reverse Osmosis (RO) ที่ได้รับจากบริษัทโพรแลค (ประเทศไทย) จำกัด
2. อาหารเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ สารเคมี และสารละลาย  
อาหารเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ได้แก่ MRS broth (Merck, เยอรมนี) tomato juice agar O-F agar bacteriological agar และ bacto-peptone (HiMedia Laboratories อินเดีย) สารเคมีและสารละลายเป็นเกรด AR จากผู้ผลิตต่างๆ ดังนี้ 2 4 6-tripyridyl triazine (Sigma-Aldrich, สหรัฐอเมริกา) Gram's straining 3% (w/v)

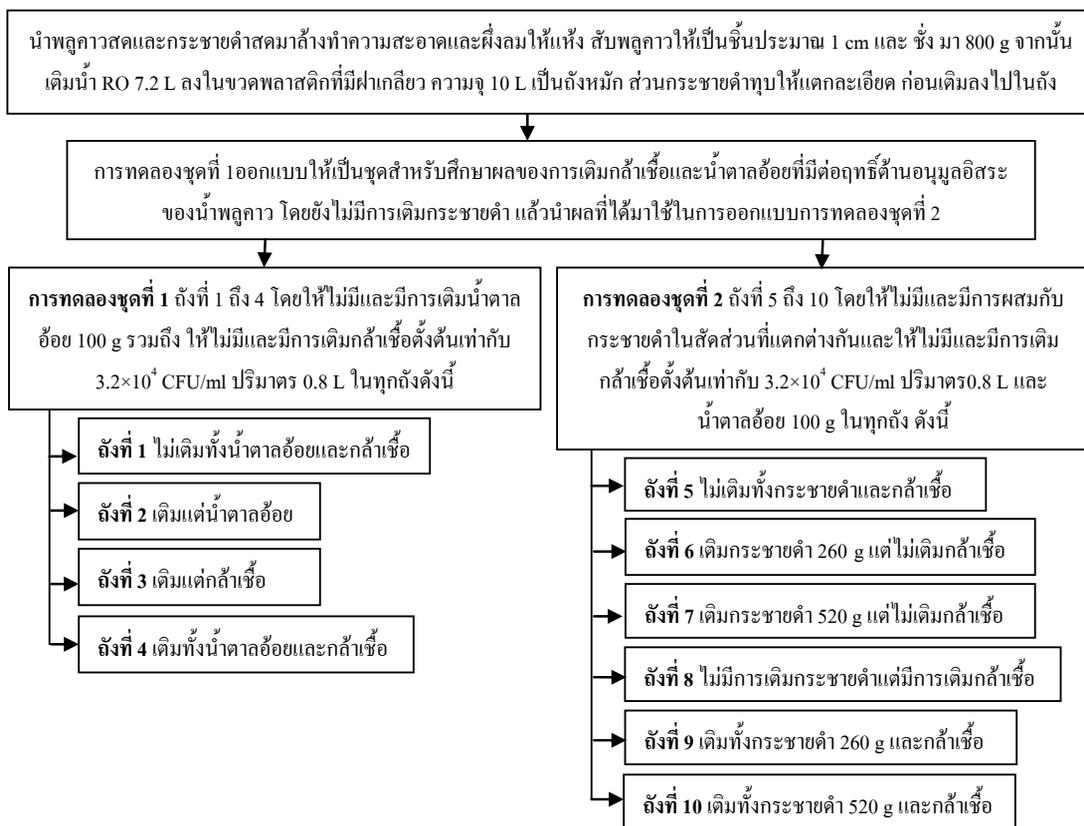
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, phenol, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HCl (BDH Laboratory Supplies, อังกฤษ) glucose, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, glycerol, activated carbon, phenolphthalein, NaOH, FeSO<sub>4</sub> (Univar, ออสเตรเลีย) CaCl<sub>2</sub> เป็นเกรด commercial lactic acid acetic acid เป็นเกรด HPLC (Merck เยอรมนี)

**3. อุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์**

อุปกรณ์และเครื่องแก้วที่ใช้ในเทคนิคปลอดเชื้อทางจุลชีววิทยา เครื่องสลัดน้ำ ชุดอุปกรณ์ในการไต่เตรท candle jar เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง รุ่น Cb 40 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น PT1200 และ เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ รุ่น 2K15 จากเยอรมนี เครื่องผสมสารละลายในแนวตั้ง รุ่น VM-300

จากไต้หวัน หม้อนึ่งแรงดันไอน้ำ รุ่น 1941X และ HPLC column รุ่น OA8 จากสหรัฐอเมริกา กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CHS เครื่องวัดการดูดกลืนแสงระบบ UV-VIS รุ่น UV-1201 และ เครื่อง HPLC รุ่น LC-10AD จากญี่ปุ่น ตู้ปลอดเชื้อชนิดม่านลมผ่าน รุ่น BH 143 จากออสเตรเลีย และ ชุดดูดปล่อยสารละลายอัตโนมัติ รุ่น Neo จากฝรั่งเศส

**4. การเตรียมวัตถุดิบและกระบวนการหมักวัตถุดิบต่างๆ** ที่ใช้ประกอบด้วยขั้นตอนการเตรียม สัตว์ส่วนต่างๆ ของวัตถุดิบตลอดจนรายละเอียดของกระบวนการหมักที่แบ่งออกเป็น 2 ชุด ดังแสดงในแผนภาพข้างล่างนี้



### 5. การติดตามจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติก ในระหว่างกระบวนการหมัก

การติดตามจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกในตัวอย่างใช้วิธี spread plate technique [15] โดยนำตัวอย่างน้ำหมักปริมาตร 1 ml มาเจือจางลำดับส่วนด้วยสารละลาย 0.1% (w/v) peptone water ที่ระดับความเจือจาง  $10^{-1}$  ถึง  $10^{-7}$  ดูดตัวอย่างแต่ละระดับความเจือจางปริมาตร 0.1 ml มากลี่ยลงบนผิววุ้นอาหาร MRS ที่มีการเติม 1.0% (w/v)  $\text{CaCO}_3$  นำไปบ่มที่  $30^\circ\text{C}$  ในสภาพ microaerophilic โดยใช้ candle jar เป็นเวลา 1-3 วัน นับจำนวน โคลนีนที่มีโซนใส จากนั้นนำไปตรวจสอบลักษณะพื้นฐานของแบคทีเรียกรดแลคติก [16]

### 6. วิเคราะห์ลักษณะสมบัติทางเคมี

นำตัวอย่างน้ำหมัก 10 ml มาดูดซับสีด้วยผงถ่านกัมมันต์ แบ่ง 5 ml มาวัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธี Phenol-Sulfuric [17] นำตัวอย่างที่เหลือ 5 ml มาวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ก่อนแล้วจึงนำมาเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการต้มเดือดและทิ้งให้เย็นลงใหม่ ๆ 95 ml แล้วนำมาวัดปริมาณกรดทั้งหมด (total acidity) ตามวิธีมาตรฐาน AOAC [18]

### 7. การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอินทรีย์ด้วยวิธี HPLC

การวิเคราะห์ชนิดและวัดปริมาณกรดอินทรีย์ด้วยวิธี HPLC [19] โดยนำตัวอย่างน้ำหมัก 1 ml มากกรองด้วยแผ่นเยื่อกรองขนาด  $0.45\ \mu\text{m}$  มาวิเคราะห์โดย mobile phase ที่ใช้คือ  $0.005\ \text{N}\ \text{H}_2\text{SO}_4$  คอลัมน์ที่ใช้คือ Vertisep OA  $8\ \mu\text{m}$  ขนาด  $7.8 \times 300\ \text{mm}$  ตัวตรวจวัด คือ UV detector ที่  $280\ \text{nm}$  อุณหภูมิ  $50^\circ\text{C}$  อัตราไหล  $0.6\ \text{ml}/\text{min}$  โดยใช้กรดแลคติกและกรดอะซิติกเป็น external standard

### 8. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity assay)

การวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใช้วิธี ferric reducing antioxidant power (FRAP) method [20] โดยเตรียม FRAP reagent ที่ประกอบด้วย

acetate buffer  $300\ \text{mmol}/\text{l}$  pH 3.6 : TPTZ (2,4,6-tripyridyl triazine)  $10\ \text{mmol}/\text{l}$  ใน  $40\ \text{mmol}/\text{l}\ \text{HCl} : \text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$   $20\ \text{mmol}/\text{l}$  (10 : 1 : 1) ใช้สารตัวอย่าง  $100\ \mu\text{l}$  และ DI water  $300\ \mu\text{l}$  เติม FRAP reagent ปริมาตร 3 ml ทิ้งไว้ 8 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่  $593\ \text{nm}$  และทำกราฟมาตรฐานที่เตรียมจาก  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $100\text{--}1,000\ \mu\text{mol}/\text{l}$ ) เพื่อเปรียบเทียบค่ากิจกรรมการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน

## ผลการวิจัยและอภิปรายผล

### 1. ผลการตรวจติดตามจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกในระหว่างกระบวนการหมัก และวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ

การตรวจติดตามจำนวนแบคทีเรียและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือในระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลูควาใช้เป็นตัวบ่งชี้ผลของการเติมน้ำตาลอ้อย และเติมกล้าเชื้อลงไปใต้น้ำปลูควาว่ากล้าเชื้อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานหรือไม่ ถ้าใช้ก็จะมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือลดลงและจำนวนแบคทีเรียเพิ่มมากขึ้นในระหว่าง 30 วันของการหมักตามลำดับ โดยในกระบวนการหมักมีการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในปริมาณเริ่มต้นที่  $3.2 \times 10^4\ \text{CFU}/\text{ml}$  จึงมีการตรวจติดตามการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกด้วยการนับจำนวนในระหว่างการหมักน้ำปลูควา และเพื่อเป็นการยืนยันด้วยว่า แบคทีเรียที่ตรวจพบและเพิ่มจำนวนขึ้นมาก็คือแบคทีเรียกรดแลคติก จึงได้ทดสอบลักษณะสมบัติพื้นฐานสำคัญบางประการของแบคทีเรียกรดแลคติก ได้แก่ การย้อมติดสีแกรมบวก และไม่พบว่ามีกรสร้างสปอร์ การสร้างกรดและขับออกนอกเซลล์โดยเห็นเป็นโซนใสอยู่โดยรอบโคโลนีที่เจริญอยู่บนผิววุ้นอาหาร MRS [21] ที่มีการดัดแปลงด้วยการเติม 1.0% (w/v)  $\text{CaCO}_3$  โดย Kopermsub และคณะ [22] โซนใสโดยรอบโคโลนีของแบคทีเรียบนวุ้นอาหารดังกล่าว เป็นสิ่งที่ชี้ให้เห็นว่าโคโลนีนั้นๆ เป็นโคโลนีที่สร้างกรด แล้ว

ปล่อยกรดที่สร้างขึ้นออกมาทำให้ pH โดยรอบโคโลนิ้นั้นลดลงส่งผลให้  $\text{CaCO}_3$  รอบๆ โคลินี้ละลายจนเห็นเป็นโซนใสโดยรอบได้ การทดสอบการเป็นแบคทีเรียที่ใช้น้ำตาลด้วยกระบวนการหมักแล้วทำให้เกิดกรดโดยการใช้ Oxidative-Fermentative test (O-F Test) พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกนี้จะเปลี่ยนสีของอาหาร O-F เป็นสีเหลืองทั้งสองหลอด การไม่สร้างเอนไซม์อะมัยเลส เมื่อนำโคโลนิ้นี้มาทดสอบกับ 3.0% (w/v)  $\text{H}_2\text{O}_2$  แล้วไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาย่อยสลาย  $\text{H}_2\text{O}_2$  ไปเป็น  $\text{H}_2\text{O}$  กับ  $\text{O}_2$  ได้ ในการทดสอบจึงไม่เห็นฟองฟู โดยจากภาพที่ 1 พบว่าตรวจพบจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกมากที่สุดในชั่วโมงที่ 72 ดังนี้ ถึงที่ 1 ที่มีน้ำพุลูควาเพียงอย่างเดียว พบจำนวนแบคทีเรียน้อยที่สุด คือ  $6.8 \times 10^4$  CFU/ml อาจเป็นแบคทีเรียที่ติดปะปนมาตามธรรมชาติ (indigenous microorganisms) กับพุลูควาเนื่องจากน้ำพุลูควาที่นำมาใช้ ไม่ได้ผ่านขั้นตอนการทำให้ปลอดเชื้อโดยสิ้นเชิง จึงยังมีแบคทีเรียตามธรรมชาติเหล่านี้หลงเหลืออยู่ได้ ทั้งนี้เคยมีการศึกษาโดย Duangjitcharoen และคณะ [23] ที่สามารถแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ติดปะปนมาตามธรรมชาติกับเครื่องต้มน้ำลูกยอหมักและยังพบว่าแบคทีเรียเหล่านี้ยังสร้างกรดแลคติกระหว่างการหมักได้ด้วย แสดงว่าแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถอยู่ติดปะปนมาตามธรรมชาติกับสมุนไพรรัดได้ในขณะที่ถึงที่ 2 ที่มีการเติมน้ำตาลอ้อยแต่ไม่เติมกล้ำเชื้อ พบแบคทีเรียมากกว่าถึงที่ 1 คือ  $5.8 \times 10^7$  CFU/ml เพราะจุลินทรีย์ที่ติดปะปนมาตามธรรมชาติกับพุลูควา สามารถใช้น้ำตาลอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อเพิ่มจำนวนได้ อย่างไรก็ตามในถึงที่ 3 ที่มีการเติมกล้ำเชื้อแต่ไม่เติมน้ำตาลอ้อยพบแบคทีเรียน้อยกว่าถึงที่ 2 คือ  $6.3 \times 10^5$  CFU/ml ทั้งนี้เป็นเพราะแบคทีเรียในถึงที่ 3 ขาดแหล่งคาร์บอน และพบว่าในถึงที่ 4 พบจำนวนแบคทีเรียมากที่สุด เมื่อเทียบกับถึงที่ 1 2 และ 3 คือ  $8.2 \times 10^9$  CFU/ml เนื่องจากมีการเติมทั้งกล้ำเชื้อและน้ำตาลอ้อย ทำให้จำนวนแบคทีเรียตั้งต้น ที่มีทั้งกล้ำเชื้อ และ

แบคทีเรียที่ติดปะปนมาตามธรรมชาติกับพุลูควาเพิ่มจำนวนได้มากกว่าถึงอื่น ๆ น้ำตาลอ้อย มี sucrose หรือ invert sugar เป็นองค์ประกอบอยู่มากกว่าร้อยละ 99 [24] ทั้งนี้ตามรายงานของ Chen และคณะ [25] พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถใช้ sucrose เป็นแหล่งคาร์บอนได้ sucrose เป็นน้ำตาล disaccharides ที่ประกอบด้วย monosaccharide 2 ชนิด คือ glucose และ fructose เชื่อมกันด้วยพันธะ  $\alpha$ -1 2-glycosidic และ sucrose นั้นยังสามารถแตกตัวออกเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวดังกล่าวได้ โดยใช้เอนไซม์  $\alpha$ -glucosidase; EC 3.2.1.20 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทั้ง glucose และ fructose ที่แตกตัวออกมาจาก sucrose นี้จะถูกแบคทีเรียนำเข้าสู่เซลล์ เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้ [26] นอกจากนี้แบคทีเรียกรดแลคติกจะสามารถใช้ sucrose เป็นแหล่งคาร์บอนได้ และยังเคยมีผลงานวิจัยที่พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกหลายชนิดที่มีกิจกรรมของ  $\alpha$ -glucosidase อาทิ จากผลการศึกษาของ Cort และคณะ [27] สามารถคัดแยก *Lactobacillus brevis* ที่มีกิจกรรมของ  $\alpha$ -glucosidase ได้หลังจากการหมักเบียร์ที่ใช้ยีสต์ในการหมักในช่วงแรก โดยพบว่า *Lactobacillus plantarum* และ *Pediococcus pentosaceus* มี  $\alpha$ -glucosidase เหมือนกับที่พบในยีสต์เช่นเดียวกัน ผลการตรวจติดตามจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกในระหว่างกระบวนการหมักน้ำพุลูควาร่วมกับกระชายดำ โดยมีการเติมน้ำตาลอ้อย 100 g ในทุกถัง พบว่าถึงที่ 5 ที่มีน้ำพุลูควาเพียงอย่างเดียวพบจำนวนแบคทีเรียเท่ากับ  $8.5 \times 10^7$  CFU/ml ในขณะที่ถึงที่ 6 และ 7 ที่มีการเติมกระชายดำ 260 และ 520 g แต่ไม่เติมกล้ำเชื้อ พบจำนวนแบคทีเรียใกล้เคียงกับถึงที่ 5 เท่ากับ  $3.1 \times 10^7$  และ  $2.5 \times 10^7$  CFU/ml ตามลำดับ ทั้งนี้เป็นเพราะแบคทีเรียที่ติดปะปนมาตามธรรมชาติสามารถใช้ น้ำตาลอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนได้เช่นเดียวกัน ในขณะที่ถึงที่ 8 ที่มีการเติมกล้ำเชื้อ มีจำนวนแบคทีเรียมากกว่า ถึงที่ 5 6 และ 7 คือ  $7.3 \times 10^8$

CFU/ml ส่วนถึงที่ 9 และ 10 ที่มีการเติมกระชายดำ 260 และ 520 g และเติมกล้าเชื้อ พบแบคทีเรียมากกว่าถึงที่ 5 6 และ 7 แต่ใกล้เคียงกับถึงที่ 8 คือ  $4.9 \times 10^8$  และ  $7.1 \times 10^8$  CFU/ml ตามลำดับ สรุปได้ว่าน้ำตาลอ้อยมีผลต่อจำนวนแบคทีเรียที่ตรวจพบในน้ำหมักพลูควาและน้ำหมักพลูควาผสมกับกระชายดำ นอกจากนั้นยังพบว่า การเพิ่มจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในถังต่างๆ นี้ สอดคล้องกับปริมาณการใช้น้ำตาลและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือที่สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้การสิ้นสุดกระบวนการหมักในวันที่ 30 จากภาพที่ 2 จะเห็นได้ว่าในทุกถังจะมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลดลง ยกเว้นถึงที่ 1 และ 3 ที่ไม่มีการเติมน้ำตาลอ้อย จึงวัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือไม่ได้ โดยถึงที่ 2 ที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อ แต่มีการเติมน้ำตาลอ้อย มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ 18.5 g/l จากปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้น 60.9 g/l แม้ไม่มีการเติมกล้าเชื้อก็ยังมีจุลินทรีย์ที่ติดปะปนมาตามธรรมชาติที่สามารถใช้น้ำตาลอ้อยได้ ส่วนถึงที่ 4 ที่มีทั้งการเติมกล้าเชื้อและน้ำตาลอ้อย มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ 0.59 g/l จากปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้น 63.5 g/l เนื่องจากถึงที่ 4 มีกล้าเชื้อที่ใช้น้ำตาลอ้อยเพิ่มขึ้นส่งผลให้พบจำนวนแบคทีเรียมากกว่าถึงที่ 2 ส่วนถึงที่ 5 ถึง 10 ซึ่งทุกถังมีการเติมน้ำตาลอ้อยและกล้าเชื้อ พบว่าในถึงที่ 5 6 และ 7 มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ 16.6 19.3 และ 14.1 g/l จากปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้น 54.1 49.8 และ 51.4 g/l ตามลำดับ ซึ่งแม้ไม่มีการเติมกล้าเชื้อแต่ก็ยังมีจุลินทรีย์ที่ติดปะปนมาตามธรรมชาติกับพลูควาที่ใช้น้ำตาลอ้อยได้ และถึงที่ 8 9 และ 10 ซึ่งเป็นถึงที่เติมน้ำตาลอ้อย และกล้าเชื้อนั้น จะมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ 6.3 5.4 และ 5.7 g/l จากปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้น 48.3 52.5 และ 49.6 g/l ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถเพิ่มจำนวนได้เพราะได้ใช้น้ำตาลอ้อยไปในระหว่างการหมัก ส่งผลให้มีค่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือลดลงโดยลำดับและแปรผันโดยตรงกับจำนวนแบคทีเรียที่พบในทุกถัง

## 2. ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมด (total acidity) และค่าความเป็นกรด-ต่าง (pH)

เมื่อมีปริมาณของน้ำตาลลดลงและจำนวนแบคทีเรียเพิ่มก็แสดงว่า มีการใช้น้ำตาลอ้อยด้วยกระบวนการหมักแล้วทำให้เกิดกรด จึงมีการวัดค่า pH และหาปริมาณกรดทั้งหมดระหว่างกระบวนการหมักเป็นเวลา 30 วัน จากการวัดปริมาณกรดทั้งหมดและค่าความเป็นกรด-ต่าง ในน้ำหมักพลูควาที่ไม่ผสมกระชายดำ จะพบว่าในถึงที่ 1 ที่ไม่มีการเติมน้ำตาลอ้อยและกล้าเชื้อ จะมีปริมาณกรดน้อยที่สุดคือ 1.34 g/l และค่า pH เท่ากับ 5.57 ในถึงที่ 2 ที่มีการเติมน้ำตาลอ้อย จะมีปริมาณกรดเท่ากับ 10.20 g/l และมีค่า pH เท่ากับ 3.81 เนื่องจากแบคทีเรียที่ติดปะปนมาตามธรรมชาติสามารถใช้น้ำตาลอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานแล้วสร้างกรดออกมา [28] ในถึงที่ 3 มีการเติมกล้าเชื้อ พบว่ามีปริมาณกรดน้อยกว่าถึงที่ 2 แต่มากกว่าถึงที่ 1 คือ 3.54 g/l และมีค่า pH เท่ากับ 4.12 เนื่องจากไม่มีการเติมน้ำตาลอ้อยให้กล้าเชื้อมีน้ำตาลไปใช้ในการหมัก จึงสร้างกรดได้น้อยกว่า และในถึงที่ 4 ที่มีการเติมทั้งกล้าเชื้อและน้ำตาลอ้อย จะมีปริมาณกรดมากที่สุดเมื่อเทียบกับถึงที่ 1 2 และ 3 คือ 11.59 g/l และมีค่า pH เท่ากับ 3.43 โดยปริมาณกรดที่เกิดขึ้นน่าจะมาจากทั้งกล้าเชื้อและแบคทีเรียที่ติดปะปนมาตามธรรมชาติที่สามารถใช้น้ำตาลอ้อยได้แล้วผลิตกรดในกระบวนการหมักได้ดังที่กล่าวมา ซึ่งตามนิยาม แบคทีเรียกรดแลคติกคือกลุ่มของแบคทีเรียที่สามารถใช้ glucose ด้วยกระบวนการหมักและเปลี่ยนไปเป็นกรดแลคติกเป็นส่วนใหญ่ [29] พบว่านอกจากแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถใช้ glucose แล้ว ยังสามารถใช้ fructose ด้วยกระบวนการหมักและทำให้เกิดกรดแลคติกได้อีกด้วย [30] ส่วนผลการวัดปริมาณกรดทั้งหมดและค่าความเป็นกรด-ต่างในน้ำหมักพลูควาที่ผสมกับกระชายดำ โดยมีการเติมน้ำตาลอ้อย 100 g ในทุกถัง พบว่าในถึงที่ 5 ที่ไม่เติมทั้งกระชายดำและกล้าเชื้อ จะมีปริมาณกรดน้อยที่สุดคือ 8.46 g/l และมีค่า pH 5.50 ในถึง

ที่ 6 และ 7 ที่มีการเติมกระชายดำ 260 และ 520 g แต่ไม่เติมกล้ำเชื้อ จะมีปริมาณกรดเท่ากับ 10.12 และ 10.23 g/l และมีค่า pH เท่ากับ 3.31 และ 3.44 ตามลำดับ ในถังที่ 8 ที่ไม่เติมกระชายดำ แต่เติมกล้ำเชื้อ จะมีปริมาณกรดเท่ากับ 11.61 g/l และมีค่า pH เท่ากับ 3.72 ส่วนในถังที่ 9 และ 10 ที่มีการเติมทั้งกระชายดำ 260 และ 520 g และกล้ำเชื้อจะมีปริมาณกรดสูงสุดเมื่อเทียบกับถังที่ 5 6 7 และ 8 คือ 11.91 และ 13.98 g/l และมีค่า pH เท่ากับ 3.38 และ 3.40 ตามลำดับ (ภาพที่ 3) ปริมาณกรดทั้งหมดกับค่า pH มีความสัมพันธ์กันและสามารถบ่งชี้กิจกรรมการหมักได้โดยปริมาณกรดจะสัมพันธ์โดยตรงกับกิจกรรมการหมักและผูกพันกับค่า pH ดังนั้นถังที่มีการเติมน้ำตาลอ้อย และกล้ำเชื้อจะทำให้ปริมาณกรดเพิ่มมากขึ้นและ ค่า pH ลดลงกว่าถังที่ไม่เติมทั้งน้ำตาลอ้อยและกล้ำเชื้อ

### 3. ผลการวิเคราะห์ชนิด ปริมาณกรดอินทรีย์ และค่าการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (FRAP value) ในน้ำหมักพลูควา ที่ไม่มีการผสมกระชายดำ

ผลจากการวิเคราะห์ชนิด ปริมาณกรดอินทรีย์ที่เกิดระหว่างการหมักโดยเทคนิค HPLC และค่าการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักในวันที่ 30 พบว่าในถังที่ 1 ที่ไม่มีการเติมทั้งกล้ำเชื้อและน้ำตาลอ้อย ไม่สามารถตรวจพบกรดแลคติก แต่จะมีกรดอะซิติกน้อยกว่าถังอื่นๆ คือ 0.69 g/l และมีค่า FRAP เท่ากับ 78.71  $\mu\text{mol/l}$  แสดงว่าแบคทีเรียที่ติดปะปนมาตามธรรมชาติกับพลูควานั้นเจริญได้น้อยเพราะขาดแหล่งคาร์บอน (ภาพที่ 4) ในถังที่ 2 ซึ่งเป็นถังที่ไม่มีการเติมกล้ำเชื้อแต่มีการเติมน้ำตาลอ้อยนั้นจะมีปริมาณของกรดแลคติกและกรดอะซิติกมากกว่าถังที่ 1 คือเท่ากับ 3.26 และ 6.88 g/l ตามลำดับ เนื่องจากจุลินทรีย์ตามธรรมชาติเจริญได้ดีกว่าเพราะมีแหล่งคาร์บอนจากการเติมน้ำตาลอ้อย และมีค่า FRAP เท่ากับ 155.86  $\mu\text{mol/l}$  (ภาพที่ 5) ในถังที่ 3 ที่มีการเติมกล้ำเชื้อแต่ไม่เติมน้ำตาลอ้อยนั้น จะมีปริมาณของกรดแลคติกและกรดอะซิติก

มากกว่าถังที่ 1 แต่น้อยกว่าถังที่ 2 คือเท่ากับ 0.27 และ 1.53 g/l ตามลำดับ เนื่องจากไม่มีการเติมน้ำตาลอ้อยที่เป็นแหล่งคาร์บอน และมีค่า FRAP เท่ากับ 100.14  $\mu\text{mol/l}$  (ภาพที่ 6) และในถังที่ 4 ที่มีการเติมทั้งกล้ำเชื้อและน้ำตาลอ้อยนั้นจะมีปริมาณกรดกรดแลคติก และอะซิติกสูงที่สุด เมื่อเทียบกับถังที่ 1 2 และ 3 คือเท่ากับ 8.02 และ 16.03 g/l ตามลำดับ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าทั้งแบคทีเรียกรดแลคติกที่ติดปะปนมาตามธรรมชาติกับพลูควา และกล้ำเชื้อที่เติมลงไปจะมีชนิดที่เป็น heterofermentative lactic acid bacteria ที่เมื่อใช้น้ำตาลด้วยการหมักแล้วจะเกิดกรดแลคติก ประมาณ 50% และกรดอื่นๆ เช่น กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ [31] โดยแบคทีเรียที่ติดปะปนมาตามธรรมชาตินี้ก็จะใช้ glucose และ fructose ด้วยกระบวนการหมักจนเกิดกรดแลคติกและอะซิติกได้เช่นกัน และการที่ปริมาณกรดอะซิติกมากกว่าปริมาณกรดแลคติกของทุกถังนั้น อาจจะเป็นผลที่เกิดจากปฏิกิริยา fructose reduction ใน heterofermentation ของแบคทีเรียกรดแลคติก โดย fructose จะถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดอะซิติก และ mannitol ในกระบวนการหมัก [32] และนอกจากนั้นในถังที่ 4 ยังมีค่า FRAP สูงที่สุดเมื่อเทียบกับถังที่ 1 2 และ 3 คือเท่ากับ 271.57  $\mu\text{mol/l}$  ซึ่งเพิ่มมากขึ้นกว่า 3.5 เท่าของน้ำพลูควาหมักที่ได้จากถังที่ 1 (ภาพที่ 7) ดังนั้นในถังที่ 4 ที่มีการเติมทั้งน้ำตาลอ้อย และกล้ำเชื้อ จะทำให้ปริมาณกรดอินทรีย์เพิ่มขึ้น ส่งผลให้มีฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันมากกว่าถังที่ 1 ที่ไม่มีการเติมทั้งน้ำตาลอ้อยและกล้ำเชื้อ

### 4. ผลการวิเคราะห์ชนิด ปริมาณกรดอินทรีย์ และค่าการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (FRAP value) ในน้ำหมักพลูควาที่มีการผสมกระชายดำ

ผลจากการวิเคราะห์ชนิด ปริมาณกรดอินทรีย์ โดยใช้ HPLC และค่าการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันในน้ำหมักพลูควาที่มีการเติมและไม่เติมกระชายดำ เติมน้ำตาลอ้อย และเติมน้ำตาลอ้อยที่เตรียมไว้ 800 g

เติมน้ำตาลอ้อย 100 g เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักในวันที่ 30 พบว่าในถังที่ 5 ที่ไม่มีการเติมทั้งกระชายดำและกล่ำเชื้อ จะมีปริมาณกรดแลคติก กรดอะซิติก 8.48 และ 2.01 g/l ตามลำดับ และมีค่า FRAP เท่ากับ 505.67  $\mu\text{mol/l}$  ส่วนถังที่ 6 ที่มีการเติม กระชายดำ 260 g แต่ไม่มีการเติมกล่ำเชื้อจะมีปริมาณกรดแลคติกและกรดอะซิติกมากกว่าถังที่ 5 คือ 10.75 และ 3.63 g/l ตามลำดับ และมีค่า FRAP เท่ากับ 521.22  $\mu\text{mol/l}$  ผลของถังที่ 7 ที่มีการเติมกระชายดำ 520 g และไม่มีเติมกล่ำเชื้อ จะมีปริมาณกรดแลคติกและกรดอะซิติกใกล้เคียงกับถังที่ 6 แต่มากกว่าถังที่ 5 คือ 10.58 และ 2.52 g/l ตามลำดับ และมีค่า FRAP เท่ากับ 546.22  $\mu\text{mol/l}$  แต่ในผลของถังที่ 8 ที่ไม่มีการเติมกระชายดำ แต่มีการเติมกล่ำเชื้อจะมีปริมาณกรดแลคติกและกรดอะซิติกมากกว่าถังที่ 5 6 และ 7 คือ 12.94 และ 3.57 g/l ตามลำดับ เนื่องจากกล่ำเชื้อที่เติมลงไปเจริญได้ดีกว่า และมีค่า FRAP เท่ากับ 547.33  $\mu\text{mol/l}$  ส่วนในถังที่ 9 ที่มีการเติมทั้งกระชายดำ 260 g และกล่ำเชื้อ จะพบปริมาณกรดแลคติกและกรดอะซิติกสูงกว่าถังที่ 5 6 7 และ 8 คือ 14.19 และ 4.15 g/l ตามลำดับ เนื่องจากกล่ำเชื้อที่เติมลงไปเพิ่มจำนวน จึงสร้างกรดออกมามากขึ้นตามจำนวนของแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้น และมีค่า FRAP เท่ากับ 591.78  $\mu\text{mol/l}$  และผลของถังที่ 10 ที่มีการเติมทั้งกระชายดำ 520 g และกล่ำเชื้อ จะมีปริมาณกรดแลคติกและกรดอะซิติกใกล้เคียงกับถังที่ 9 แต่มากกว่าถังที่ 5 6 7 และ 8 คือ 16.17 และ 4.06 g/l ตามลำดับ เนื่องจากแบคทีเรียที่เติมลงไปเพิ่มจำนวนมากที่สุดก็จะสร้างกรดได้ปริมาณกรดมากกว่า และถังที่ 10 มีค่า FRAP สูงที่สุดเมื่อเทียบกับถังที่ 5 6 7 8 และ 9 คือเท่ากับ 891.0  $\mu\text{mol/l}$  ซึ่งเพิ่มมากขึ้นกว่า 11.3 เท่า ของน้ำพุลูควาหมักที่ได้จากถังที่ 1 ที่ไม่มีการเติมทั้งน้ำตาลอ้อยและกล่ำเชื้อ เนื่องจากถังที่ 10 มีการเติมกระชายดำในสัดส่วนที่มากกว่าถังที่ 9 หนึ่งเท่าตัวคือ 520 g จากผลการทดลองของถังที่ 5-10 พบว่ากระชายดำมีผลโดยตรงต่อการเพิ่มค่า FRAP ให้กับน้ำหมักพุลูควา แต่ไม่มีผลเพิ่ม

ปริมาณของกรดแลคติกและกรดอะซิติก ยิ่งไปกว่านั้นพบว่าปริมาณของกรดอินทรีย์จากแบคทีเรียกรดแลคติกที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักมีผลเสริมให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้น (ภาพที่ 8) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Shori [33] ที่ได้ศึกษาปริมาณกรดอินทรีย์ในนมวัวหมักที่หมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกพบว่าเมื่อค่า pH ลดลง ปริมาณกรดทั้งหมดและกรดอินทรีย์สูงขึ้นจะช่วยเสริมฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ รวมถึงจากการศึกษาของ Devbhuti และคณะ [34] ที่ได้รายงานว่าอนุมูลแลคเตท (lactate ion) ซึ่งได้จากการแตกตัวของกรดแลคติกนั้นสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ อีกทั้งจากที่กล่าวมาแล้วการใช้ยาสมุนไพรนิยมผสมสมุนไพรหลายชนิดอันเป็นวิธีที่ปฏิบัติสืบทอดกันมาตั้งแต่บรรพบุรุษในตำรับยาหม้อ โดยมีหลักวิชาการทางเภสัชกรรมว่าการใช้สมุนไพรผสมกันก็เพื่อช่วยเสริมการออกฤทธิ์ได้ ทั้งนี้โดยงานวิจัยของ Chaiyasut และคณะ [35] ที่ได้ศึกษาเกี่ยวกับการใช้สมุนไพรไทย 5 ชนิดคือ พุลูควา มะขามป้อม ลูกยอ สมอไทย และ กระชายดำ มาหมักรวมกันโดยใช้กล่ำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก พบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้นเท่ากับ 31.31 mg GAE/ml ดังนั้นในถังที่ 10 ที่มีการผสมกระชายดำในอัตราส่วน 520 กรัม เติมน้ำตาลอ้อย และกล่ำเชื้อลงไปจนถึงแล้วหมัก จะช่วยทำให้ฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันสูงขึ้นมากกว่าถังอื่น ๆ รวมถึงถังที่ 1

## สรุปผลการวิจัย

แนวทางในการเพิ่มคุณค่าทางด้านสุขภาพให้แก่ผลิตภัณฑ์น้ำดื่มสมุนไพรพุลูควา ที่นำเสนอในการศึกษาครั้งนี้ คือการใช้น้ำพุลูควาที่ผสมกับกระชายดำ และหมักด้วยกล่ำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก ส่งผลให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำพุลูควาเพิ่มขึ้นกว่า 11.3 เท่าของน้ำพุลูควาที่ไม่มีการเติมทั้งกล่ำเชื้อและน้ำตาลอ้อย และนับเป็นแนวทางที่มีประสิทธิภาพในการเพิ่มคุณค่าทางด้านสุขภาพให้แก่ผลิตภัณฑ์น้ำดื่มสมุนไพรพุลูควาดัดยทำให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้น จากที่กล่าวมาแล้วว่า อนุมูลอิสระเป็นสาเหตุในการทำให้

เกิดผลเสียต่อสุขภาพ อาทิ การเสื่อมโทรมของเซลล์ และเนื้อเยื่อ การเกิดเนื้องอกและเซลล์มะเร็ง ดังนั้น เมื่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้น ก็จะไปทำลายอนุมูลอิสระได้มากขึ้น นอกจากนั้นพบว่า การเติมน้ำตาลอ้อย นั้นมีความจำเป็นอย่างยิ่งในกระบวนการหมักทั้งที่ใช้ พลูควาอย่างเดียวหรือที่ใช้พลูควาผสมกับกระชายดำ แต่อย่างไรก็ตามการเติมน้ำเกลือแบคทีเรียกรดแลคติก ในการหมักนั้นอาจจะมีความจำเป็นรองลงมาหาก แบคทีเรียกรดแลคติกที่ติดปะปนมาตามธรรมชาติกับ ต้นสมุนไพรต่าง ๆ ซึ่งก็อาจจะพบได้ในพลูควาและ กระชายดำด้วยนั้น สามารถเพิ่มจำนวนได้เมื่อมีแหล่ง คาร์บอนอย่างเพียงพอ นอกจากนั้นกรดแลคติก และ กรดอะซิติกที่ได้จากการหมักมีส่วนช่วยเสริมฤทธิ์ต้าน อนุมูลอิสระของน้ำพลูควาได้อีกด้วย ส่วนการเติม กระชายดำมีส่วนทำให้เป็นผลิตภัณฑ์ใหม่ที่มีฤทธิ์ต้าน อนุมูลอิสระมากกว่าผลิตภัณฑ์น้ำพลูควาเพียงอย่างเดียว โดยใช้สัดส่วนคือ พลูควา 800 g และกระชายดำ 520 g กล้าเชื้อ 0.8 L ที่มีจำนวนแบคทีเรียตั้งต้นที่  $3.2 \times 10^4$  CFU/ml และน้ำตาลอ้อย 100 g น้ำสะอาด อาทิ น้ำ RO ปริมาตร 7.2 L

### กิตติกรรมประกาศ

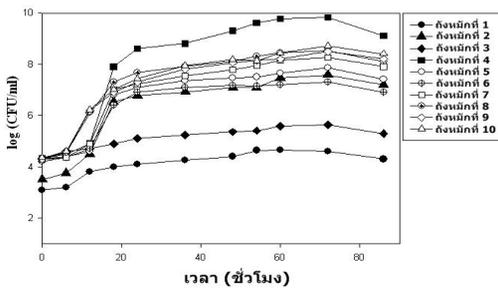
คณะวิจัยฯ ขอขอบคุณ คุณทิพย์พิมล สิงห์พันธ์ คุณธิดารัตน์ จันทร์ตรา ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยขอนแก่น สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และบริษัทโพรแลค (ประเทศไทย) จำกัด ที่ให้การสนับสนุนเอื้อเฟื้อกิจกรรมการดำเนินการวิจัย

### เอกสารอ้างอิง

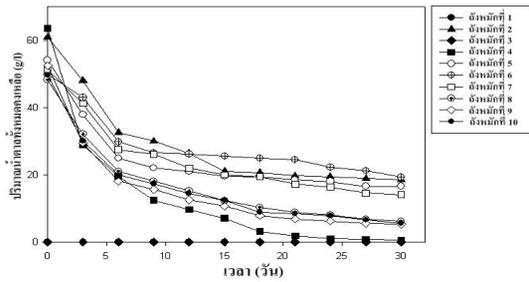
1. Larsen K. Saururaceae. FM 2000;7: 344-346.
2. Rathi RS, Somnath R, Singh SK. Ethnobotanical notes on *Houttuynia cordata* Thunb. in North-eastern region of india. Indian J Nat Prod Resour 2014;4:432-435.
3. Lu HM, Liang YZ, Wu XJ, Qiu P. Tentative fingerprint efficiency study of *Houttuynia cordata* injection in quality control of traditional Chinese traditional medicine. Chem Pharm Bull 2006;54:725-730.
4. Lau KM, Lee KM, Koon CM, Cheung CSF, Lau CP, Ho HM, et al. Immunomodulatory and anti-SARS activities of *Houttuynia cordata* Thunb. J Intercult Ethnopharmacol 2008;118:79-85.
5. Cai Y, Qiong L, Mei S, Harold C. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. Life Sci 2004;74:2157-2184.
6. Pietta PG. Flavonoids as Antioxidants. J Nat Prod 2000;63:1035-1042.
7. Wang L, Zhao Y, Zhou L, Zhou J. Chemical constituents of *Houttuynia cordata*. Chinese Trad Herb Drug 2007;38:1788-1790.
8. Lin KH, Yang YY, Yang CY, Huang MY, Lo HF, Liu KC. Antioxidant activity of herbaceous plant extracts protect against hydrogen peroxide-induced DNA damage in human lymphocytes. BMC Res Notes 2013;6:490.
9. Kim HS, Kim MJ, Cheong C, Kang SA. Antioxidant properties in water and 70% ethanol extracts of *Houttuynia Cordata* Thunb. J Korea Acad Industr Coop Soc 2013;14:5091-96.
10. Sennin J, Theechale M. *Krachaidum*: The book series of Thai medicinal herbs. 2<sup>nd</sup> ed. Nonthaburi: KPM media Siam; 2002. Thai.

11. Sutthanut K. The overview of “*Krachai-dum*” (*Kaempferia parviflora*). Paper presented at seminar conference on pharmacology. Khon Kaen University; 2003.
12. Nanasombat S, Bubpasawan T, Tamaput N, Srimakhan Y. Antimicrobial activity of Thai medicinal plants against beverage spoilage microorganisms and their potential in retarding Alzheimer’s disease progression. *Phcog Commn* 2014;4:77-87.
13. Wang CY, Ng CC, Su H, Shyu YT. Probiotic potential of noni juice fermented with lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Int J Food Sci Nutr* 2009;60:98-106.
14. Hu CC, Hsiao CH, Huang SY, Fu SH, Lai CC, Hong TM, Chen HH, Lu FJ. Antioxidant Activity of fermented Soybean Extract. *J Agr Food Chem* 2004;52:5735-5773.
15. Jackson GJ, Merker RI, Bandler R. *FDA’s Bacteriological Analytical Manual (BAM)*. 8<sup>th</sup> ed. USA: Silver Spring; 1998.
16. William ST, Sharp EM, Holt JG. *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology V4*. London: Williams & Wilkins; 1989.
17. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substance. *Anal Chem* 1956;28:350-365.
18. William H. *Official Methods of Analysis of AOAC international*. USA: Gaithersburg; 2000.
19. Visessanguan W, Benjakul S, Smitinont T, Thepkasikul P, Panya A. Changes in microbiological, biochemical and physico-chemical properties of *Nham* inoculated with different inoculum levels of *Lactobacillus curvatus*. *LWT-Food Sci Technol* 2006; 3:814-826.
20. Benzie FF, Strain JJ. Ferric Reducing antioxidant power assay direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for Simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Method Enzymol* 1999;299:15-23.
21. de Man JC, Rogosa M, Sharpe ME. A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *J Appl Bacteriol* 1960;23:130-135.
22. Kopermsub P, Vichitphan S, Yunchalard S. Lactic Acid Bacteria isolated from *Plaa-som*, a Thai Fermented Fish Product. *Thai J Biotechnol* 2006;7:32-39.
23. Duangjitcharoen Y, Kantachote D, Ongsakul M, Poosaran N, Chaiyasut C. Selection of probiotic lactic acid bacteria isolated from fermented plant beverages. *Pakistan J Biol Sci* 2008;15:652-655.
24. Rajvaidya N, Markandey DK. *Environmental Biochemistry*. India: Kul Bhushan Nangia ND; 2005.
25. Chen KH, Mcfeeters RF, Fleming HP. Fermentation Characteristics of Heterolactic Acid Bacteria in green bean juice. *J Food Sci* 1983;48:962-966.

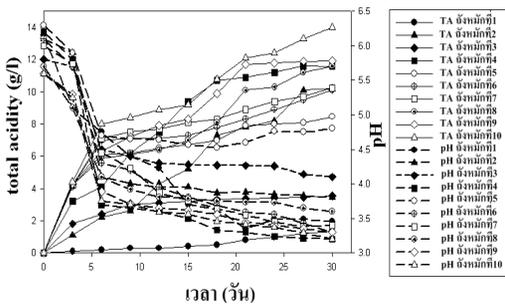
26. Schomburg D. Information on EC 3.2.1.20 alpha-glucosidase [Internet] 2015 [updated 2010 Jan 1; cited 2015 Feb 2]. Available from: <http://www.brenda-enzymes.info/enzyme.php?ecno=3.2.1.20>.
27. Cort SD, Kumara HS, Verachert H. Localization and Characterization of  $\alpha$ -Glucosidase Activity in *Lactobacillus brevis*. *App Environ Microbiol* 1994; 60:3074-3078.
28. Timbuntam W, Sriroth K, Tokiwa Y. Lactic acid production from sugar cane juice by a newly isolated *Lactobacillus* sp. *Biotechnol Lett* 2006;28:811-814.
29. Kandler O, Weiss N. Regular, non-sporing Gram-positive rods. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 9<sup>th</sup> ed. edited by Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG. USA: Baltimore MD; 1984.
30. Wood BJD, Holzappel WH. The genera of lactic acid bacteria. Ed. London: Chapman and Hall; 1995.
31. Steindl R. Syrup Clarification for Plantation White Sugar to meet New Quality Standards. In Hogarth, DM, Eds. *Proceedings of the 25<sup>th</sup> Congress of International Society of Sugar Cane Technologists*, Guatemala city; 2005.
32. Cho JH, Lee DY, Yang CN, Jeon JI, Kim JH, Han HU. Microbial population dynamics of kimchi, a fermented cabbage product. *FEMS Microbiol Lett* 2006;257:262-267.
33. Shori AB. Antioxidant activity and viability of lactic acid bacteria in soybean-yogurt made from cow and camel milk. *J Taibah University Sci* 2013; 7:202-208.
34. Devbhuti P, Roy S, Sarkar RG, Devbhuti D. An *In Vitro* Study on Effect of Lactic Acid and Ascorbic Acid on Etoposide-Induced Lipid Peroxidation. *J Pharma Sci Tech* 2013; 2:91-95.
35. Chaiyasut C, Kusirsin W, Lailerd N, Lerttrakarnnon P, Suttajit M, Srichairatanakool S. Effect of phenolic compound of fermented Thai indigenous plant on oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Evid Based Complementary Altern Med* 2011;1-10.



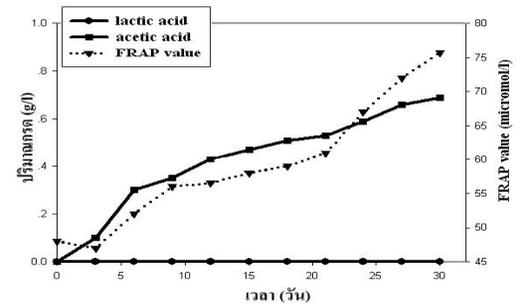
ภาพที่ 1 ผลการตรวจติดตามจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติก ในถังที่ 1-10 ณ เวลาต่างๆ



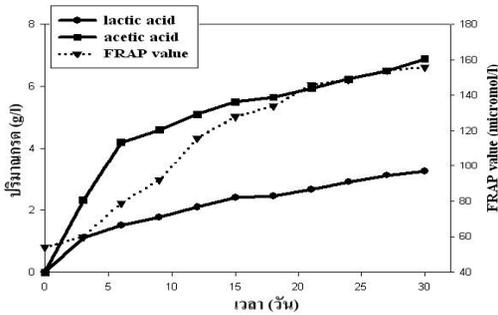
ภาพที่ 2 ผลการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลทั้งหมด กงเหลือ ในถังที่ 1-10 ณ เวลาต่างๆ



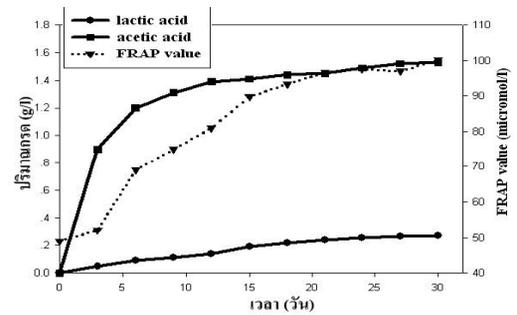
ภาพที่ 3 ผลการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดทั้งหมด (TA) และค่า pH ในถังที่ 1-10 ณ เวลาต่างๆ



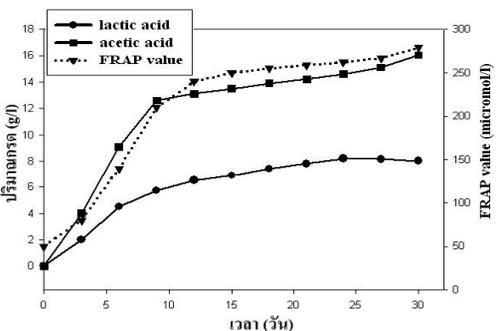
ภาพที่ 4 ผลการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดแลคติก กรดอะซิติก และค่า FRAP ในถังที่ 1



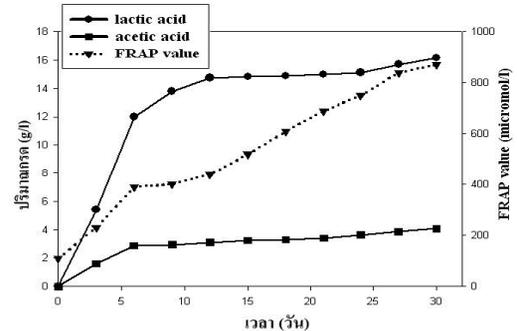
ภาพที่ 5 ผลการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดแลคติก กรดอะซิติก และค่า FRAP ในถังที่ 2



ภาพที่ 6 ผลการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดแลคติก กรดอะซิติก และค่า FRAP ในถังที่ 3



ภาพที่ 7 ผลการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดแลคติก กรดอะซิติก และค่า FRAP ในถังที่ 4



ภาพที่ 8 ผลการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดแลคติก กรดอะซิติก และค่า FRAP ในถังที่ 10