



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส และต้านแบคทีเรีย

ของคีเฟอร์นมธัญพืช

Antioxidant, Antityrosinase and Antibacterial Activities
of Grains Milk Kefir

โดย มนตรา ศรีษะแย้ม

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี

พ.ศ. 2562

หัวข้อวิจัย	กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส และต้านแบคทีเรียของคีเฟอร์นมธัญพืช
ชื่อผู้วิจัย	ดร. มนตรา ศรีชะแย้ม
หน่วยงาน	สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
ปีงบประมาณ	2560

บทคัดย่อ

คีเฟอร์เป็นผลิตภัณฑ์นมที่มีรายงานว่าผ่านการหมักมีฤทธิ์ทางชีวภาพเพิ่มขึ้น แต่การศึกษาการทำคีเฟอร์ด้วยนมธัญพืชยังขาดการศึกษาอย่างมาก งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของคีเฟอร์นมธัญพืช ในการต่อต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไทโรซิเนส ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อให้เกิดสิว (*Propionibacterium acnes* DMST 14916 และ *Staphylococcus aureus* DMST 8013) และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ HaCaT การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใช้วิธี DPPH radical scavenging การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไทโรซิเนสใช้วิธี mushroom tyrosinase inhibition ทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี agar well diffusion และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ HaCaT ด้วยวิธี MTT assay ผลที่ได้พบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของคีเฟอร์นมงด้าที่ระยะเวลาหมัก 72 ชั่วโมง มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงสุด มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.78 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ผลการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่าคีเฟอร์นมข้าวโพดยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไทโรซิเนสได้สูงสุด พบ % inhibition เท่ากับ 99.60±0.06% ที่ระยะเวลาหมัก 72 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพของตัวอย่างคีเฟอร์ทั้ง 3 ชนิด ในการยับยั้งแบคทีเรีย พบว่าคีเฟอร์นมงด้า 250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรที่ระยะเวลาหมัก 72 ชั่วโมง สามารถยับยั้งเชื้อ *P. acnes* DMST 14916 ได้สูงสุด (14.67±0.58 มิลลิเมตร) ขณะที่คีเฟอร์นมข้าวโพด 250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรที่ระยะเวลาหมัก 72 ชั่วโมง สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* DMST 8013 ได้สูงสุด (25.00±1.00 มิลลิเมตร) นอกจากนี้พบว่านมธัญพืชทั้ง 3 ชนิด มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงขึ้นเมื่อผ่านกระบวนการหมัก แต่อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงความเป็นพิษต่อเซลล์ HaCaT พบว่ามีความเป็นพิษสูงในระดับความเข้มข้นที่ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า คีเฟอร์นมธัญพืชสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เวชสำอางได้ แต่ควรจำกัดความเข้มข้นที่ใช้ให้เหมาะสม

Research Title	Antioxidant, Antityrosinase and Antibacterial Activities of Grains Milk Kefir
Author	Montra Srisayam, Ph.D.
Faculty	Department of Microbiology, Faculty of Science and Technology, Pibulsongkram Rajabhat University
Budget Year	2017

Abstract

Kefir is milk product which was reported that biological activity of milk can be increased when milk pass fermentation. The aims of this study were to determine the antioxidant and the antityrosinase activities, to evaluate the inhibition of acne-inducing bacteria (*Propionibacterium acnes* DMST 14916 and *Staphylococcus aureus* DMST 8013) and to investigate cytotoxicity on HaCaT cells of grain milk kefir. The antioxidant capacity was measured using DPPH radical scavenging assay. The antityrosinase activity was tested based on mushroom tyrosinase inhibition assay. The antibacterial activity was carried out by agar well diffusion method. The cytotoxicity was examined by MTT assay. The results demonstrated that the black sesame milk kefir obtained from 72 h fermentation had the highest antioxidant activity with the IC_{50} values of 0.78 mg/ml. The antityrosinase activities from corn milk kefir from 72 h fermentation were displayed in the highest level with the percentage of inhibition of $99.60 \pm 0.06\%$. As the effective antibacterial activity was compared in all three types of kefir. Evaluation of antibacterial activity demonstrated that the inhibition of *P. acnes* DMST 14916 by the 250 mg/ml black sesame milk kefir obtained from 72 h fermentation (14.67 ± 0.58 mm) was the highest value. The corn milk kefir fermented at 72 h had the highest value to inhibit *S. aureus* DMST 8013 with inhibition zone of 25.00 ± 1.00 mm at the concentration of 250 mg/ml. In addition, it was found that the biological activities of three types of kefir were increased with fermentation process. However, cytotoxicity of HaCaT cells showed high value in the concentration of 50 mg/ml. Based on results of this investigation, application of grain milk kefir in cosmeceuticals is possible but the concentration of grain milk kefir needs to appropriate.

กิตติกรรมประกาศ

รายงานการวิจัยเรื่อง กิจกรรมด้านอนุมูลอิสระ ด้านเอนไซม์ไทโรซิเนส และด้านแบคทีเรียของคีเฟอร์นมธัญพืช ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม ปีงบประมาณ 2560

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณคณะกรรมการบริหารงานวิจัย สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม ที่ช่วยดำเนินการและประสานงานตลอดโครงการ

ขอขอบคุณ สาขาวิชาชีววิทยา สาขาวิชาจุลชีววิทยาและสาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม ที่ได้ให้ความกรุณา อุปกรณ์ เครื่องมือ และสถานที่ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณศูนย์วิทยาศาสตร์คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม ที่ได้ให้ความกรุณา อุปกรณ์ เครื่องมือ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ สาขาวิชาชีววิทยา สาขาวิชาจุลชีววิทยาและสาขาวิชาเคมี ที่อำนวยความสะดวกและให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัย

มนตรา ศรีชะแย้ม

มกราคม 2562

สารบัญ

บทที่	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
1 บทนำ	1
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 คีเฟอร์ (kefir)	3
2.2 อนุมูลอิสระ (free radical)	4
2.3 สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)	5
2.4 กระบวนการเกิดเม็ดสีเมลานิน	7
2.5 กระบวนการเพื่อผิวขาวกระจ่างใส	7
2.6 เชื้อแบคทีเรียก่อโรคสิวและหนอง	8
2.7 ถั่วเหลือง	9
2.8 งาดำ	10
2.9 ข้าวโพด	11
3 วิธีดำเนินการวิจัย	14
3.1 อุปกรณ์	14
3.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ	15
3.3 คีเฟอร์	15
3.4 วิธีดำเนินการวิจัย	15
4 ผลการวิจัย	19
4.1 ลักษณะทางกายภาพของคีเฟอร์นมธัญพืชและน้ำหนักแห้ง	19
4.2 ผลทดสอบการยับยั้งเชื้อ <i>Propionibacterium acnes</i> ด้วยวิธี agar well diffusion	21

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4.3 ผลทดสอบการยับยั้งเชื้อ <i>Staphylococcus aureus</i> ด้วยวิธี agar well diffusion	23
4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของคีเฟอร์นมธัญพืชด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay	24
4.5 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส	25
4.6 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ HaCaT	26
5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	28
5.1 สรุปผลการวิจัย	28
5.2 อภิปรายผล	29
5.3 ข้อเสนอแนะ	31
เอกสารอ้างอิง	32
ภาคผนวก	37
ภาคผนวก ก	38
ภาคผนวก ข	39
ภาคผนวก ค	40
งานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์	43
ประวัติผู้วิจัย	58

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.7.1	องค์ประกอบสำคัญทางเคมีของเมล็ดถั่วเหลือง 100 กรัม	9
2.8.1	องค์ประกอบสำคัญทางเคมีของเมล็ดงาดำ 100 กรัม	11
2.9.1	องค์ประกอบสำคัญทางเคมีของเมล็ดข้าวโพดหวาน 100 กรัม	13
4.1	ลักษณะทางกายภาพของคีเฟอร์นมธัญพืชหมักและน้ำหมักแห้ง	21
4.2	ผลการยับยั้งเชื้อ <i>Propionibacterium acnes</i> ของคีเฟอร์นมธัญพืช	22
4.3	ผลการยับยั้งเชื้อ <i>Staphylococcus aureus</i> ของคีเฟอร์นมธัญพืช	23
4.4	ผลค่า IC50 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของคีเฟอร์นมธัญพืช	24
4.5	ค่าการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไทโรซิเนสของคีเฟอร์นมธัญพืชที่ ระยะเวลาการหมัก 24 48 และ 72 ชั่วโมง	26
4.6	ความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ HaCaT ของคีเฟอร์นมธัญพืชที่ระยะเวลา การหมัก 72 ชั่วโมง	27
ภาคผนวก ค ที่ 1	ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของคีเฟอร์นมธัญพืช	41

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
4.1	ลักษณะของ ก) คีเฟอร์นมถั่วเหลือง ข) คีเฟอร์นมงาดำ และ ค) คีเฟอร์นมข้าวโพด	20
4.2	ลักษณะของ ก) คีเฟอร์นมถั่วเหลือง ข) คีเฟอร์นมงาดำ และ ค) คีเฟอร์นมข้าวโพด ที่ผ่านการทำแห้ง	20
4.3	เปรียบเทียบการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของคีเฟอร์นมธัญพืช	25
ภาคผนวก ก ที่ 1	ลักษณะของหัวเชื้อคีเฟอร์ (kefir grain)	37
ภาคผนวก ข ที่ 1	ลักษณะการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของคีเฟอร์นมธัญพืชเกิดขึ้นเป็นวงใส รอบหลุมบรรจุสารละลายคีเฟอร์ที่ระดับความเข้มข้น 50 100 และ 250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีน้ำกลั่นฆ่าเชื้อเป็นตัวควบคุมผลลบ และ ampicillin เป็นสารควบคุมผลบวก	38
ภาคผนวก ค ที่ 1	ลักษณะการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของคีเฟอร์นมธัญพืช ซึ่งเปลี่ยน สารละลาย DPPH จากสีม่วงเป็นสีส้มเหลือง ตามระดับความเข้มข้น ของคีเฟอร์เพิ่มขึ้น	39

บทที่ 1

บทนำ

ผลิตภัณฑ์นมหมักเป็นอาหารประเภทหนึ่งที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย ช่วยในระบบขับถ่าย และยังเป็นประโยชน์สำหรับบุคคลที่แพ้โปรตีนในนมสัตว์ไม่สามารถรับประทานนมได้โดยบริโภคนมหมักแทน เป็นแหล่งโปรตีน วิตามินและแร่ธาตุหลายชนิด ผลิตภัณฑ์นมหมักที่เรารู้จักเป็นอย่างดีคือ โยเกิร์ต ขณะที่ผลิตภัณฑ์นมหมักอีกชนิดหนึ่งที่มีกระจายอยู่ทั่วไปทั้งในประเทศและต่างประเทศแต่อาจไม่เป็นที่รู้จักดีเท่าโยเกิร์ต คือ คีเฟอร์ (kefir) ซึ่งมีรายงานองค์ประกอบที่มีความสำคัญทางชีวภาพ ช่วยส่งเสริมสุขภาพและถือเป็น probiotic product (Farnworth, 1999; Mascarher et al, 2003)

คีเฟอร์ประกอบด้วยจุลินทรีย์หลายชนิด ได้แก่ lactic acid bacteria acetic acid bacteria และ yeast ขณะที่โยเกิร์ตเกิดจากกระบวนการหมักของจุลินทรีย์กลุ่ม lactic acid bacteria เพียงอย่างเดียว มีรายงานว่า คีเฟอร์สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ เนื่องจากความเป็นกรด และมีการผลิต bacteriocin จากกลุ่ม lactic acid bacteria ซึ่งมีความปลอดภัยและเป็นประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมอาหารเพื่อใช้ในการถนอมอาหาร และใช้แทนสารปฏิชีวนะในผลิตภัณฑ์อาหารบางประเภทได้ (Klaenhammer, 1998; Stiles and Hasting, 1991) นอกจากนี้ยังมีผลดีต่อสุขภาพมากมาย โดยมีความสามารถเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ด้านการอักเสบ ด้านมะเร็ง ช่วยให้ผิวขาว กระจ่างใสขึ้น และช่วยลดระดับคอเลสเตอรอล (Farnworth, 2005; Chen et al, 2006) อย่างไรก็ตามในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของคีเฟอร์ส่วนใหญ่ศึกษาในนมสัตว์ เช่น นมวัว นมแพะ หรือการศึกษาในนมพืชที่พบโดยมาก ได้แก่การศึกษาในนมถั่วเหลือง (Wang et al., 2006; Rekha and Vijayalakshmi, 2008) แต่ยังคงขาดการศึกษาในธัญพืชอื่น ๆ อีกมาก ที่สามารถผลิตเป็นนมได้นอกจากนี้ยังมีรายงานว่านมถั่วเหลืองหมัก คีเฟอร์มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมากกว่าน้ำนมถั่วเหลืองที่ไม่ได้ผ่านการหมัก (Wang et al., 2006; Rekha and Vijayalakshmi, 2008)

จึงเป็นเหตุให้ผู้วิจัยสนใจศึกษาการออกฤทธิ์ทางชีวภาพในคีเฟอร์นมธัญพืช เพื่อประยุกต์ในด้านความงามเนื่องจากเป็นฤทธิ์ที่มีความต้องการสูงในปัจจุบัน ที่เน้นการดูแลผิวพรรณให้เรียบเนียน ไร้ริ้วรอยและขาวกระจ่างใส ฤทธิ์ดังกล่าวได้แก่ ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเม็ดสี

เมลานิน และฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ที่ก่อโรคทางผิวหนังที่ทำให้เกิดสิวและหนอง และศึกษาข้อมูลด้าน
ความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังของคีเฟอร์ เพื่อเป็นประโยชน์ในการประยุกต์ด้านเวชสำอางต่อไป

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 คีเฟอร์ (kefir)

คีเฟอร์ มีกำเนิดจากชนเผ่าพื้นเมืองของพวกคอเคซัสโดยพระธิดาเบตจากเทือกเขาเกียนเป็นคนเผยแพร่ว่า และศาสตราจารย์นายแพทย์ชาวโปแลนด์นำไปเผยแพร่ในยุโรปเนื่องจากสามารถรักษามะเร็งได้ ต่อมาได้กระจายทั่วไปในกลุ่มประเทศทางตะวันตก สำหรับในประเทศไทยส่วนใหญ่ได้รับคีเฟอร์มาจากประเทศไซเบต คีเฟอร์ หรือที่รู้จักกันในชื่อของ บัวหิมะ คือ ผลิตภัณฑ์นมหมักที่มีการรวมกลุ่มของจุลินทรีย์หลายชนิดประกอบด้วยจุลินทรีย์หลักคือแบคทีเรียแลคติก (*Lactic acid bacteria*) ได้แก่ *Lactococci* sp., *Leuconostoc* sp. และ yeast หลากหลายชนิด (Mascher et al., 2003) คีเฟอร์ เป็นผลิตภัณฑ์นมที่มีการหมักเพื่อผลิตนมที่มีกรดและแอลกอฮอล์เล็กน้อย กรดในนมชนิดนี้เป็นกรดแลคติกและกรดแลคติกทำให้เกิดความเปรี้ยว นมหมักคีเฟอร์ผลิตจากการหมักนมกับหัวเชื้อคีเฟอร์ (kefir grain) ลักษณะหัวเชื้อคีเฟอร์จะมีสีขาวเหมือนดอกกะหล่ำมีขนาดประมาณ 0.3-2 เซนติเมตร จุลินทรีย์เหล่านี้มาเกาะกลุ่มรวมกัน (cluster) แบบเอื้อประโยชน์แก่กันเป็นความสัมพันธ์แบบพึ่งพา (symbiosis) (Pintado et al., 1996; Frengova et al., 2002) มีกรดโฟลิก (Folic acid) จำนวนมาก โดยเฉพาะหากทิ้งไว้ถึง 48 ชั่วโมง กรดโฟลิกจะเพิ่มมากถึง 116 % จากปริมาณของนมเดิม จากผลการวิจัยพบว่า นมคีเฟอร์สามารถตีมีครรภ์และสามารถนำมาเลี้ยงทารกได้ (Franworth, 2003) มีน้ำตาลเชิงซ้อนที่ละลายน้ำได้ ได้แก่ คีเฟอร์แรน (Kefiran) ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ประโยชน์ได้หลายอย่าง เช่น ทำเครื่องสำอาง โดยใช้นมหมักคีเฟอร์ทาบนใบหน้าจะช่วยกระตุ้นรูขุมขน ทำให้ใบหน้าดูอ่อนเยาว์ เต่งตึง และยังช่วยขจัดสิว คีเฟอร์-แรนยังช่วยป้องกันการเกิดแผลพุพองในปากที่เกิดจากเชื้อรา (*Thrush*) ชนิด *Candida albicans* และเนื่องจากนมหมักคีเฟอร์มีสภาพเป็นกรด จึงมีคุณค่าในการบำบัดโรคของระบบทางเดินอาหาร โดยเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในนมหมักคีเฟอร์ จะผลิตกรดออกมา มีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดอาการท้องเสีย ในลำไส้ และรักษาแผลในกระเพาะลำไส้ ลดการเกิดแก๊สในทางเดินอาหาร แก้อาการท้องอืด ท้องเฟ้อ และยังช่วยย่อยจึงทำให้ระบบขับถ่ายดี เนื่องจากนมหมักคีเฟอร์อุดมสมบูรณ์ไปด้วยแร่ธาตุ และกรดอะมิโนที่จำเป็นมากชนิด จึงรักษาสุขภาพร่างกายได้แข็งแรง และโปรตีนในนม

หมักคีเฟอร์เป็นโปรตีนโมเลกุล ที่ง่ายต่อการดูดซึมไปเสริมสร้างร่างกาย ทำให้ร่างกายกลับมามีสุขภาพที่ดีขึ้น นอกจากนี้ เม็ดคีเฟอร์ยังช่วยลดคอเลสเตอรอลโดยถ้าหมักนม 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส คอเลสเตอรอลในนมจะลดลง 22.63 % จากปริมาณเริ่มต้น หมัก 48 ชั่วโมง คอเลสเตอรอลในนมจะลดลง 41.84% ปัจจุบันมีการทดลองนำคีเฟอร์มารักษาคนไข้โรคเลือด เช่น ธาลัสซีเมีย โลหิตจาง โรคเกล็ดเลือดต่ำ และในคีเฟอร์ยังจะมีการผลิตแบคทีเรียโอซินซึ่งเป็นสารประกอบประเภทโปรตีนที่ผลิตโดยแบคทีเรีย และมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่น โดยส่วนใหญ่ถูกผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติก สารชนิดนี้เป็นที่สนใจอย่างมากในด้าน การแพทย์และอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากเป็นสารที่มีความสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคหลายชนิดได้อย่างจำเพาะและผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่ถือว่ามีความปลอดภัย (Generally Recognized as Safe, GRAS) ซึ่งมนุษย์ได้นำมาใช้ประโยชน์เป็นเวลายาวนาน จึงมีการนำแบคทีเรียโอซินมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารแทนการใช้สารเคมีเพื่อประโยชน์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย และจุลินทรีย์ก่อโรคได้ แบคทีเรียโอซินชนิดแรกที้นำมาใช้ในการถนอมอาหาร และยอมรับว่าปลอดภัย คือ nisin ที่ผลิตจากเชื้อ *Lactobacillus lactis* ซึ่งช่วยแก้ปัญหาการใส่สารปฏิชีวนะในผลิตภัณฑ์อาหารบางประเภทได้ (Klaenhammer, 1998; Stiles and Hastings, 1991)

2.2 อนุมูลอิสระ (free radical)

Oxidative stress คือภาวะที่เกิดความไม่สมดุลกันระหว่างการผลิตอนุมูลอิสระ และกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ในสิ่งมีชีวิต ซึ่งอนุมูลอิสระสามารถเกิดขึ้นเองโดยกระบวนการเมตาบอลิซึมภายในเซลล์หรือถูกระตุ้นจากภายนอกเซลล์ที่มาจากสิ่งแวดล้อมภายนอก ร่างกาย ได้แก่ รังสี ก๊าซออกซิเจน สารเคมี ยา สิ่งปนเปื้อนในอากาศ สารปรุงแต่ง อนุมูลอิสระสามารถทำความเสียหายให้แก่เซลล์ได้ (Cheeseman and Slater, 1993) หากอนุมูลอิสระมีมากเกินไปกว่าร่างกายจะกำจัดได้จะก่อให้เกิดอันตรายแก่สารชีวโมเลกุลต่าง ๆ ทำให้เกิดโรคตามมา เช่น โรคหัวใจ เบาหวาน ต้อกระจก โรคหืดหอบ โรคหลอดเลือดสมอง โรคเกี่ยวกับระบบประสาท และโรคมะเร็งต่าง ๆ (Papus, 1998) นอกจากนี้ยังมีผลต่อผิวพรรณ อนุมูลอิสระชนิด reactive oxygen species (ROS) มีผลทำให้เซลล์ผิวหนังเกิดภาวะ oxidative stress (Pillai et al., 2005) กระตุ้นการสร้างเม็ดสีเมลานิน สาเหตุของผิวหมองคล้ำ ฝ้า กระ และจุดต่างด่าง เมื่อเซลล์ผิวถูกทำลายทำให้เกิดการสูญเสีย คอลลาเจน และ อีลาสติน มีผลทำให้ผิวหนังขาดความแข็งแรง และความยืดหยุ่น เหนียวนำปัญหาผิวต่าง ๆ เช่น ผิวแก่ก่อนวัย ริ้วรอย (Gupta et al., 2006) ดังนั้นถ้ายับยั้งอนุมูลอิสระได้จะทำให้ลดการเสื่อมของร่างกาย หรือแก่ก่อนวัยได้

อนุมูลอิสระสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (Reactive oxygen species, ROS) เช่น superoxide hydroxyl, hydroperoxyl, peroxy, alkoxy carbonate และ carbon dioxide กลุ่มที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (Reactive nitrogen species, RNS) เช่น nitric oxide และ nitrogen dioxide และกลุ่มที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (Reactive chlorine species, RCS) เช่น atomic chlorine (โอภา, 2550) ซึ่งปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระในสิ่งมีชีวิตเป็นการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่มีกลไกการเกิดด้วยกัน 3 ขั้นตอน คือ Initiation step, Propagation step และ Termination step (Roberfroid and Calderon 1995) ขั้นตอน Initiation step คือปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระซึ่งเกิดจาก Hydrolysis reaction ของแสง รังสี หรือ Single oxygen ก็ จะ ก่อ ให้ เกิด Hydrogen peroxide ขั้นตอน Propagation step คือ การเกิดปฏิกิริยาการดึงอะตอมไฮโดรเจนจากโมเลกุลข้างเคียงก่อให้เกิด อนุมูลอิสระใหม่เกิดต่อจากกระบวนการ Initiation step ขั้นตอน Termination step คือขั้นตอนที่อนุมูลอิสระ 2 อนุมูลรวมกันเกิดการเสถียรและหยุดยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่

2.3 สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)

สารต้านอนุมูลอิสระเป็นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งหรือชะลอปฏิกิริยาออกซิเดชัน ภายในร่างกายมีการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (superoxide dismutase) คาตาเลส (catalase) กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase) เพื่อที่จะควบคุมและป้องกันไม่ให้อนุมูลอิสระนั้นมีมากเกินไปจนทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อ อย่างไรก็ตามสารต้านอนุมูลอิสระภายในร่างกายมีปริมาณจำกัด เมื่อมีอายุที่มากขึ้นร่างกายก็จะมีการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระลดน้อยลง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องได้รับสารต้านอนุมูลอิสระจากภายนอก เช่น จากผักและผลไม้ที่อุดมไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ ถั่วเหลือง ข้าวโพดและงาดำ (จิรวาส และคณะ, 2558) โดยปกติแล้วการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายนั้นมีอย่างเพียงพอ ต่อการกำจัดอนุมูลอิสระภายในร่างกาย แต่หากมีสภาวะผิดปกติในร่างกาย เช่น ความเครียด การนอนติดต่อกันนาน ๆ การรับประทานยาที่มีผลลด antioxidant enzyme หรือสภาวะโรคต่าง ๆ ก็อาจจะทำให้การสร้างอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นจนเสียสมดุลระหว่าง สารต้านอนุมูลอิสระและอนุมูลอิสระ จะเห็นได้ว่าสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายนั้นมีความสำคัญในการป้องกันการเกิดโรคและความเสื่อมของร่างกายเป็นอย่างมาก นอกจากการไปจับกับอนุมูลอิสระแล้วสารต้านอนุมูลอิสระควรจะต้องมีคุณสมบัติดังต่อไปนี้ร่วมด้วย คือ ป้องกันการเกิดขึ้นของ reactive oxygen species (ROS) ได้สามารถจับกับ ROS ที่เกิดขึ้นก่อนที่ ROS นั้นจะไปทำอันตรายเนื้อเยื่อต่าง ๆ ต้องไม่เพิ่มความแรง

ของอนุมูลอิสระหรือไม่เปลี่ยน ROS ที่มีความแรงต่ำไปเป็น ROS ที่มีความแรงสูง เช่น ไม่เปลี่ยนจาก super oxide ไปเป็น hydroxyl radical เป็นต้น ทำให้เกิดสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของ antioxidant enzyme หรือสารต้านอนุมูลอิสระตัวอื่น ๆ และเพิ่มการแสดงออกของยีนที่ใช้สร้าง antioxidant enzyme และช่วยในการฟื้นฟูความเสียหายของเซลล์หรือเนื้อเยื่อจากการถูกทำลายด้วยอนุมูลอิสระ ซึ่งเราสามารถแบ่งสารต้านอนุมูลอิสระภายในร่างกายได้เป็น 4 ประเภทดังนี้ ประเภทที่หนึ่ง Intracellular antioxidants (antioxidant enzyme) ได้แก่ เอนไซม์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการต้านอนุมูลอิสระ เช่น catalase glutathione peroxidase superoxide dismutase ประเภทที่สอง Extracellular antioxidants ได้แก่ Vitamin C สารที่มีกลุ่ม sulfhydryl groups ประเภทที่สาม Membrane antioxidants ได้แก่ Carotenoids Ubiquinone Vitamin E ประเภทที่สี่สารที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์เอนไซม์ที่ใช้ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ Copper Manganese Selenium Zinc (Mason, 2011) โดยสารต้านอนุมูลอิสระมีกลไกในการต้านอนุมูลอิสระแบ่งเป็น 4 กลไก ได้แก่

1. Free radical scavenging สารต้านอนุมูลอิสระจะให้ไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระและทำให้อนุมูลอิสระมีความเสถียรมากขึ้น เมื่อสารต้านอนุมูลอิสระได้ให้ ไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนไปแล้วก็จะเกิดเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ซึ่งมีความรุนแรงน้อยกว่าอนุมูลอิสระเดิม อาจจะไปรวมตัวกันกับอนุมูลอิสระอีกโมเลกุลหนึ่งเกิดผลิตภัณฑ์ที่เสถียร หรือมีสารต้านอนุมูลอิสระตัวอื่น ๆ มาให้อิเล็กตรอนหรือไฮโดรเจนเพื่อเกิดผลิตภัณฑ์ที่เสถียรต่อไป สารที่มีกลไกการออกฤทธิ์ผ่านกลไกนี้ เช่น Butylated hydroxyl anisole (BHA) Vitamin E (alpha-tocopherol) เป็นต้น

2. Singlet oxygen quenching (1O_2) ออกฤทธิ์โดยไปยับยั้งการทำงานของ singlet oxygen โดยการเปลี่ยน Singlet oxygen (1O_2) ให้ไปอยู่ในรูป triplet oxygen (3O_2) และปล่อยพลังงานที่ได้รับออกไปในรูปความร้อน สารที่ออกฤทธิ์ผ่านกลไกนี้เช่น carotenoids โดย carotenoids 1 โมเลกุล สามารถทำปฏิกิริยากับ singlet oxygen ได้ 1,000 โมเลกุล

3. Metal chelating โลหะหนักเช่น Fe^{2+}/Fe^{3+} และ Cu^{2+} มีผลเร่งให้เกิดปฏิกิริยา oxidation ในร่างกายซึ่งโลหะหนักดังกล่าวจะไปเร่งการเกิดอนุมูลอิสระหลายประเภทเช่น peroxy radical, hydroxyl radical และ alkyl radical รวมถึง singlet oxygen ดังนั้นการที่มีสารไปจับกับโลหะหนักเหล่านี้จะช่วยชะลอการเกิดอนุมูลอิสระในร่างกายได้ สารที่ออกฤทธิ์ผ่านกลไกนี้ ได้แก่ flavonoids, phosphoric acid, citric acid และ ascorbic acid เป็นต้น

4. ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ (enzyme inhibitor) สารประกอบ phenolics บางชนิด เช่น flavonoids phenolic acid และ gallates สามารถยับยั้งการทำงานของ

เอนไซม์ lipooxygenase โดยสามารถเข้าจับกับไอออนของเหล็กซึ่งเป็น cofactor ส่งผลให้เอนไซม์ดังกล่าวไม่สามารถทำงานได้ (Silvia et al., 2004)

2.4 กระบวนการเกิดเม็ดสีเมลานิน

เม็ดสีเมลานินถูกสร้างขึ้นจากเซลล์ที่มีชื่อว่า melanocyte ซึ่งโดยปกติเม็ดสีเมลานินทำหน้าที่เป็นเกราะป้องกันรังสียูวีที่จะทำอันตรายต่อผิวให้เกิดอาการแดง ไหม้ แต่อย่างไรก็ตามการผลิตเม็ดสีเมลานินที่มากผิดปกติทำให้เกิดลักษณะที่ไม่พึงประสงค์ คือ ผื่น กระจุดต่างด้า และปัญหาผิวหมองคล้ำขึ้น เม็ดสีเมลานินแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ eu-melanin ที่ให้สีดำ หรือสีน้ำตาล และ phaeo-melanin ที่ให้สีแดง หรือสีเหลือง (Agar and Young, 2005) กระบวนการเกิดเม็ดสีเมลานินเริ่มต้นเมื่อผิวสัมผัสกับรังสียูวี กระตุ้นการเกิด oxidative stress ในเซลล์ชั้นนอกสุดคือ keratinocyte จากนั้น α -MSH จะถูกหลั่งจากเซลล์ keratinocyte ไปจับ receptor (MC1R) บนผิวเซลล์ melanocyte กระตุ้นการสร้างเอนไซม์ไทโรซิเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญที่ทำให้เกิดเม็ดสีเมลานิน (Galván and Alonso-Alvarez, 2009) ตามหลักชีวเคมีเกี่ยวกับกระบวนการเกิดเม็ดสีเมลานิน เริ่มจาก กรดอะมิโน tyrosine ถูก ออกซิไดซ์ไปเป็น dihydroxyphenylalanine (DOPA) โดยเอนไซม์ไทโรซิเนส จากนั้น DOPA ถูก ออกซิไดซ์ได้ dopaquinone โดยเอนไซม์ไทโรซิเนส เช่นเดียวกัน dopaquinone สามารถเปลี่ยนเป็น dopachrome ได้เอง และ dopachrome ถูก decarboxylated เป็น 5,6-dihydroxyindole ซึ่งเป็นสารที่ถูก oxidized เป็น indole 5,6-quinone สุดท้ายแล้วสารนี้ถูก polymerizes ได้เป็นเม็ดสีเมลานินที่มีสีดำ หรือ น้ำตาล (eumelanin) ส่วนการเกิดเม็ดสีเมลานินสีเหลือง หรือ สีแดง (pheomelanin) เกิดเมื่อ dopaquinone ทำปฏิกิริยากับ cysteines หรือ glutathione ได้สาร cysteinyl-dopa ซึ่งเป็นสารตัวกลางที่จะเปลี่ยนไปเป็น pheomelanin (Kim and Uyama, 2005)

2.5 กระบวนการเพื่อผิวขาวกระจ่างใส

สาเหตุสำคัญของผิวหมองคล้ำไม่กระจ่างใสคือการที่ร่างกายมีกลไกในการสร้างเม็ดสีเมลานินเพิ่มมากขึ้นจากการกระตุ้นด้วยปัจจัยภายในและภายนอก ส่งผลให้ระดับสีผิวเข้มขึ้นกว่าสีผิวเดิม กระบวนการที่ทำให้ผิวขาวกระจ่างใสสามารถแบ่งได้เป็น 3 ชั้น คือ ชั้นก่อนการสร้างเม็ดสีเมลานิน ชั้นระหว่างการสร้างเม็ดสีเมลานินและชั้นหลังการสร้างเม็ดสีเมลานิน ในชั้นก่อนการสร้างเม็ดสีเมลานิน วิธีการยับยั้งการเกิดเม็ดสีเมลานินทำได้โดยการยับยั้งผ่านกระบวนการ transcription และ glycosylation ซึ่งมีผลทำให้เกิดการลดลงของเอนไซม์ไทโรซิเนสและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง หรือขาด

ความสามารถในการทำหน้าทีไปและเกิดจากการขาดโมเลกุลที่มีหน้าที่ในการกระตุ้นกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานิน เช่น extracellular signal-regulated kinase (ERK) และ microphthalmia transcription factor (MITF) (Solano, et al., 2006) นอกจากนี้การทำลายเซลล์เมลานोไซต์เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ทำให้ไม่เกิดการสร้างเม็ดสีเมลานินเนื่องจากเซลล์ชนิดนี้เป็นเซลล์ที่มีหน้าที่ในการสร้างเม็ดสีเมลานินขึ้น ชั้นระหว่างการสร้างเม็ดสีเมลานิน เป็นการยับยั้งกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานินจากการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง (Ando et al., 2007) ชั้นสุดท้ายการยับยั้งการเกิดเม็ดสีเมลานินหลังจากสร้างเม็ดสีเมลานินเรียบร้อยแล้ว เกิดขึ้นจากวิธีการยับยั้งการขนส่งเม็ดสีเมลานินไปยังเซลล์เคลลาติโนไซต์และการผลัดเซลล์ผิว (Briganti, et al., 2003) จากที่ผ่านมานักวิจัยให้ความสนใจศึกษาค้นหาสารสกัดจากธรรมชาติที่ออกฤทธิ์เพื่อผิวขาวกระจ่างใสเป็นจำนวนมากเพื่อสนองต่อความต้องการทางการค้า ตัวอย่างสารสกัดจากธรรมชาติที่ออกฤทธิ์ให้ความขาวกระจ่างใส เช่น สารสกัดจากหม่อน ข้าว มะหาด ชาเขียว เป็นต้น ซึ่งกลุ่มสารที่ออกฤทธิ์ส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มของ phenolic, polyphenols และ flavonoids

2.6 เชื้อแบคทีเรียก่อโรคผิวหนังและหนอง

จากสถิติของสถาบันโรคผิวหนังประจำปี รายงานว่าผิวหนังเป็นสาเหตุที่ทำให้ผู้ป่วยมาพบแพทย์เป็นอันดับ 2 ของผู้ป่วยทั้งหมดและมีจำนวนผู้ป่วยมากขึ้นในแต่ละปี (สถาบันโรคผิวหนัง, 2551) สาเหตุของการเกิดผิวหนังเกิดจากปัจจัยอย่างน้อย 4 ประการรวมกัน คือ ต่อมไขมันหลังไขมันมากกว่าปกติ ผนังท่อต่อมไขมันแบ่งตัวมากกว่าปกติและไม่หลุดลอกออกท่อต่อมไขมัน และมีเชื้อแบคทีเรียอาศัยอยู่เกิดการย่อยไขมันบริเวณดังกล่าวเกิดปฏิกิริยาการอักเสบขึ้น ผิวเกิดจากแบคทีเรียที่มีชื่อว่า *Propionibacterium acnes* เป็นแบคทีเรียที่สำคัญในการทำให้เกิดสิวเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่ใช่ออกซิเจนในการเจริญเติบโต ดังนั้นจึงชอบอยู่ในที่มีความดันออกซิเจนต่ำคือส่วนลึกของต่อมไขมัน เชื้อ *P. acnes* พบน้อยมากในผู้ที่มีอายุต่ำกว่า 12 ปี และพบมากที่สุดเมื่ออายุ 15-16 ปี ในสิวลูกชายพบเชื้อ *P. acnes* ประมาณร้อยละ 77 และในสิวลูกสาวประมาณร้อยละ 72 โดยจำนวนของเชื้อ *P. acnes* ในต่อมไขมันจะเกี่ยวข้องโดยตรงกับความรุนแรงของสิว (เรณู, 2544) นอกจากนี้เชื้อ *Propionibacterium acnes* เชื้อ *Staphylococcus aureus* ก็มีความสามารถทำให้เกิดตุ่มหนอง ทำให้เกิดการอักเสบของสิวเพิ่มมากขึ้น *Staphylococcus aureus* จัดอยู่ในตระกูล Micrococcaceae แบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ เมื่อแบ่งเซลล์จะติดกันเป็นกลุ่มคล้ายพวงอุ้งนึ่ง มีบางสายพันธุ์สร้างแคปซูลหรือเมือก (slime) โคลนินบนอาหารแข็งมีลักษณะกลม เรียบ ชุ่ม นูนเล็กน้อย เชื้ออายุน้อยติดจะสีแกรมบวก เมื่ออายุมากขึ้นติดสีแกรมลบ เจริญได้ดีใน

อาหารเลี้ยงเชื้อส่วนใหญ่ในสภาพที่มีออกซิเจนหรือมีออกซิเจนน้อย (micro-aerophilic) โดยทั่วไป เชื้อนี้จะทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดี ช่วยให้เชื้อเพิ่มความรุนแรงในการก่อโรค เป็นสาเหตุของการ ติดเชื้อที่ผิวหนัง แผล หนอง (จิราภรณ์, 2555)

2.7 ถั่วเหลือง

ถั่วเหลืองเป็นพืชมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Glycine max* อยู่ในวงศ์ Fabaceae ถั่วเหลืองอุดมไปด้วยคุณค่าทางโภชนาการสูง ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมันไม่อิ่มตัว โยอาหาร แคลเซียม มีปริมาณของโซเดียมและไขมันอิ่มตัวไม่มีคอเลสเตอรอล มีคุณภาพโปรตีนสูงเทียบเท่ากับโปรตีนจากสัตว์ นอกจากนี้ยังมีองค์ประกอบที่สำคัญทางเคมีอื่น ๆ ของเมล็ดถั่วเหลือง แสดงดังตารางที่ 2.7.1 ส่วนของงอกถั่วเหลืองจะมีสารไอโซฟลาโวนส์ (isoflavones) ปริมาณสูง (Schryver, 2002) สารนี้จัดอยู่ในกลุ่มสารฟีนอลิกเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่พบมากในธรรมชาติ และมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ต้านการอักเสบ ต้านมะเร็ง ช่วยสลายลิ่มเลือด (Balasundram et al., 2005) มีโครงสร้างและการออกฤทธิ์คล้ายกับฮอร์โมนเอสโตรเจนแต่มีฤทธิ์น้อยกว่าประมาณ 1000-10000 เท่า (Messina et al., 1994) สามารถจับกับตัวรับเอสโตรเจนเบต้าที่กระดูก สมอง กระเพาะปัสสาวะทำให้ลดการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ นอกจากนี้ยังมีสารสำคัญอื่น ๆ เช่น โปรตีเอสอินฮิบิเตอร์ (protease inhibitor) ไฟโตสเตอรอล (phytosteroid) กรดฟีนอลิก (phenolic acid) สารซาโปนิน (saponin) เลซิทีน (lecithin) และกรดโอเมก้า3 (omega-3)

ตารางที่ 2.7.1 องค์ประกอบสำคัญทางเคมีของเมล็ดถั่วเหลือง 100 กรัม

องค์ประกอบสำคัญ	ปริมาณ
พลังงาน (calories)	471
ความชื้น (%)	12.5
โปรตีน (g)	35.3
ไขมัน (g)	19.0
คาร์โบไฮเดรต (g)	23.7
เยื่อใย (g)	4.5
เถ้า (g)	5.0
แคลเซียม (mg)	240

ตารางที่ 2.7.1 (ต่อ)

ฟอสฟอรัส (mg)	580
เหล็ก (mg)	9.4
โซเดียม (mg)	1
โพแทสเซียม (mg)	1900
แคลโรทีน (µg)	12
ไนอะซีน (mg)	2.2
วิตามิน บี1 (mg)	0.83
วิตามิน บี2 (mg)	0.30

ที่มา: Namiki, (1995)

2.8 งาดำ

งาดำเป็นพืชที่มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Sesamum indicum* L. จัดอยู่ในวงศ์ Pedaliaceae งาดำเป็นพืชล้มลุกที่มีเมล็ดขนาดเล็กสีน้ำตาลนำมาใช้เป็นอาหารมากกว่า 5,000 ปี ซึ่งประชากรทั่วโลกนิยมบริโภคงาดำในรูปอาหารและมีน้ำมันปริมาณสูงมากประมาณ 34-50% ของน้ำหนักเมล็ด นอกจากนี้ยังมีองค์ประกอบที่สำคัญทางเคมีอื่น ๆ ของเมล็ดงาดำ แสดงดังตารางที่ 2.8.1 งาดำนับเป็นธัญพืชที่ให้คุณประโยชน์ต่อสุขภาพอย่างยิ่ง โดยงาดำมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่สำคัญสูง คือ กรดโอเลอิก (oleic acid) และกรดลิโนลิก (linoleic acid) มีโปรตีน คาร์โบไฮเดรต โยอาหาร แร่ธาตุ เช่น แคลเซียม ฟอสฟอรัส เหล็ก โซเดียม โพแทสเซียม ซีรีเนียม วิตามินบี 1 บี 2 แคลโรทีน และไนอะซีน มีสารต้านอนุมูลอิสระกลุ่มลิกแนน (lignans) ที่สำคัญ 2 ชนิด ได้แก่ สารเซซามิน (sesamin) และเซซาโมลิน (sesamol) ซึ่งมีคุณสมบัติในการต้านทานปฏิกิริยาออกซิเดชัน และมีคุณสมบัติในการต้านทานแบคทีเรีย สารลิกแนนช่วยชะลอความแก่ และยังช่วยลดคอเลสเตอรอล ช่วยระบบการหมุนเวียนโลหิตลดปฏิกิริยาที่จะทำให้เกิดมะเร็ง ในงาดำมีเมทิลโอโนนและทริบิโตเฟนอยู่ปริมาณมาก ดังนั้นหากรับประทานถั่วเหลืองพร้อมกับงาดำจะทำให้ได้โปรตีนครบถ้วน (ชนิดา, 2548)

ตารางที่ 2.8.1 องค์ประกอบสำคัญทางเคมีของเมล็ดงาดำ 100 กรัม

องค์ประกอบสำคัญ	ปริมาณ
พลังงาน (calories)	578
ความชื้น (%)	4.7
โปรตีน (g)	19.8
ไขมัน (g)	51.9
คาร์โบไฮเดรต (g)	15.3
เยื่อใย (g)	3.1
เถ้า (g)	5.2
แคลเซียม (mg)	1200
ฟอสฟอรัส (mg)	540
เหล็ก (mg)	9.6
โซเดียม (mg)	2
โพแทสเซียม (mg)	400
แคโรทีน (μg)	17
ไนอะซิน (mg)	5.1
วิตามิน บี1 (mg)	0.95
วิตามิน บี2 (mg)	0.25

ที่มา: Namiki, (1995)

2.9 ข้าวโพด

ข้าวโพดหวานมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Zea mays* Linn. จัดอยู่ในวงศ์ Gramineae ข้าวโพดเป็นพืชตระกูลหญ้า มีลำต้นตั้งตรง มีปล้อง ใบเรียวยาวติดอยู่กับต้นบริเวณปล้อง ฝักจะออกบริเวณกลางลำต้นตรงข้อ มีช่อดอกที่ปลายยอด (นวลนภา, 2546) เมล็ดข้าวโพดมีคาร์โบไฮเดรต ประมาณร้อยละ 70 ไขมันประมาณร้อยละ 4 สามารถสกัดเป็นน้ำมันนอกจากนี้ยังมี องค์ประกอบที่สำคัญทางเคมีอื่น ๆ ของเมล็ดข้าวโพด แสดงดังตารางที่ 2.9.1 ข้าวโพดมี กรดไลโนเลอิก

ตารางที่ 2.9.1 องค์ประกอบสำคัญทางเคมีของเมล็ดข้าวโพดหวาน 100 กรัม

องค์ประกอบสำคัญ	ปริมาณ
พลังงาน (calories)	86
ความชื้น (%)	53-76
โปรตีน (g)	3.2-4.9
ไขมัน (g)	1.2-1.9
คาร์โบไฮเดรต (g)	19.0-39.3
เยื่อใย (g)	2
แคลเซียม (mg)	2-4
ฟอสฟอรัส (mg)	89-116
เหล็ก (mg)	0.4-0.5
วิตามินเอ (mg)	281-435 (I.U.)
วิตามินซี(mg)	7-10
ไนอะซิน (mg)	1.5-1.7
วิตามิน บี1 (mg)	0.06-0.15
วิตามิน บี2 (mg)	0.06-0.15

ที่มา: กองโภชนาการ, (2530) และ USDA Nutrient database

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์

1. ขวดโหลแก้วขนาด 300 ml
2. ขวดโหลแก้วขนาด 500 ml
3. ช้อนพลาสติก
4. กระจกพลาสติก
5. ถ้วยตวง
6. นมพาสเจอร์ไรซ์ไขมัน 0%
7. หัวเชื้อ Kefir
8. Beaker ขนาด 250 ml
9. Cylinder ขนาด 10, 25, 50, 100, 250, 500 ml
10. Erlenmeyer flask ขนาด 250 ml
11. Funnel
12. Forceps
13. Hot air oven
14. Autoclave
15. Laminar air flow
16. Loop
17. Micropipette ขนาด 2-20 μ l, 20-200 μ l, 100-1000 μ l
18. Cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 mm
19. Test Tube
20. Eppendorf
21. ขวดเตรียม Media ขนาด 250, 500, 1000 ml
22. เขียง
23. เครื่องชั่ง

24. เครื่องปั่น
25. จานอาหารเลี้ยงเชื้อ
26. ซ้อนตักสาร
27. ตะกร้า
28. แท่งแก้ว
29. ผ้าขาวบาง
30. มีด
31. Anaerobic jar
32. 96 Well plate

3.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ

เชื้อที่ใช้ในการทดสอบได้มาจากกรมวิทยาการแพทย์ มี 2 ชนิด ดังนี้ คือ *Staphylococcus aureus* DMST 8013 และ *Propionibacterium acnes* DMST 14916

3.3 คีเฟอร์

คีเฟอร์ (Kefir cultures DC 1000 l (Danisco, Poland))

3.4 วิธีดำเนินการวิจัย

3.4.1 การเพาะเลี้ยงหัวเชื้อคีเฟอร์

ทำการกระตุ้นหัวเชื้อคีเฟอร์ให้เจริญโดยใช้คีเฟอร์ผงทางการค้า (Kefir cultures DC 1000 l) 1 กรัม ผสมให้เข้ากันกับนมพาสเจอร์ไรส์ปริมาตร 200 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมากรองเพื่อเก็บเม็ดคีเฟอร์ (kefir grain) และเพิ่มจำนวนหัวเชื้อโดยใช้เม็ดคีเฟอร์ 10 กรัม ต่อนมพาสเจอร์ไรส์ปริมาตร 200 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการกรองและเก็บเม็ดคีเฟอร์ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อต่อไป

3.4.2 การเตรียมตัวอย่างคีเฟอร์จากนมถั่วเหลืองและนมงาดำ

การทำนมธัญพืช เริ่มจากนำเมล็ดถั่วเหลืองและงาดำ อย่างละ 250 กรัม แช่น้ำไว้เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นให้เมล็ดแตกโดยการเติมน้ำลงไป 1,000 มิลลิลิตร (250 กรัม : 1,000 มิลลิลิตร) นำส่วนน้ำที่กรองได้ไปต้มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที พักให้

เย็นจะได้นมถั่วเหลืองและนมงาดำ จากนั้นเตรียมนมทั้ง 2 ชนิด ใส่ในโหลแก้วเพื่อทำการหมัก โหลละ 200 มิลลิลิตร ชนิดละ 3 โหล แล้วนำหัวเชื้อคีเฟอร์ 5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เติมลงไปในแต่ละโหล ผสมให้เข้ากัน ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง หลังการบ่มทำการกรองแยกเม็ดคีเฟอร์ (kefir grain) ออก และนำนมที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 x g เป็นเวลา 10 นาที แยกตะกอนทิ้งนำของเหลวที่ได้คือคีเฟอร์ไปเข้าเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dry) เพื่อทำให้แห้ง และเก็บคีเฟอร์แห้งไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไทโรซิเนสและฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อสิวต่อไป

3.4.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอ้างอิงจากวิธีของ Srisayam and Chantawannakul (2010) นำตัวอย่างคีเฟอร์มาทำเป็นสารละลายโดยใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อ เจือจางตัวอย่างคีเฟอร์ให้ได้ความเข้มข้นที่ 0.5-15 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เตรียมสารละลาย DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายให้อยู่ในรูปของอนุมูลอิสระ DPPH ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.01 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ทำการทดสอบโดยการดูดตัวอย่างคีเฟอร์ แต่ละความเข้มข้นปริมาตร 0.75 มิลลิลิตร ใส่ลงในสารละลาย DPPH ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex ทิ้งไว้ 15 นาทีในที่มืด นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยมี ascorbic acid เป็น positive control นำค่าที่ได้มาคำนวณหา % inhibition ซึ่ง % inhibition สามารถคำนวณได้ตามสมการ (1) (Srisayam and Chantawannakul, 2010) และรายงานเป็นค่า IC₅₀ คือ ความเข้มข้นของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% ได้จากการสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % inhibition กับความเข้มข้นของตัวอย่างคีเฟอร์ที่ใช้

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(\text{Absorbance } 517 \text{ Control} - \text{Absorbance } 517 \text{ Sample}) \times 100}{\text{Absorbance } 517 \text{ Control}}$$

3.4.4 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อให้เกิดสิวด้วยวิธี Agar well diffusion

แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบได้แก่ *P. acnes* DMST 14916 และ *S. aureus* DMST 8013 ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *S. aureus* DMST 8013 ในอาหารเหลว nutrient broth (NB) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วน *P. acnes* DMST 14916 เลี้ยงในอาหาร brain heart infusion (BHI) broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน โดยเพาะเลี้ยงใน anaerobic jar เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นปรับความขุ่นของเชื้อทดสอบให้ได้เท่ากับความขุ่น

มาตรฐาน McFarland No.0.5 (1.5×10^8 CFU/ml) สำหรับเชื้อ *S. aureus* DMST 8013 และ McFarland No.2 (6×10^8 CFU/ml) สำหรับเชื้อ *P. acnes* DMST 14916 ทำการ spread plate ในอาหาร nutrient agar (NA) สำหรับเชื้อ *S. aureus* DMST 8013 และ spread plate ในอาหาร brain heart infusion agar สำหรับเชื้อ *P. acnes* DMST 14916 เจาะหลุมโดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร จากนั้นละลายตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้มีระดับความเข้มข้นเท่ากับ 50 100 และ 250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลุม ใช้ยาปฏิชีวนะ ampicillin ที่ระดับความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เป็น positive control และน้ำกลั่นฆ่าเชื้อเป็น negative control นำเชื้อ *S. aureus* DMST 8013 ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ เชื้อ *P. acnes* DMST 14916 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนใน anaerobic jar เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บันทึกผลการทดสอบโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง มีหน่วยเป็นมิลลิเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ (Srisayam and Chantawannakul, 2010)

3.4.5 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไทโรซิเนส

วิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไทโรซิเนสดัดแปลงมาจาก Momtaz *et al.* (2008) ใช้ตัวอย่างคีเฟอร์ที่ละลายในน้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร 60 ไมโครลิตร เติมสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.1 โมลาร์, pH 6.8) ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ผสมกับเอนไซม์ mushroom tyrosinase (Sigma-Aldrich, USA) 25 ยูนิต/มิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใน 96 well plate จากนั้นเติมสารตั้งต้น (substrate) L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) ที่ละลายใน 0.1 โมลาร์ PBS pH 6.8 ปริมาตร 80 ไมโครลิตร โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายของตัวอย่างคีเฟอร์เท่ากับ 15 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 475 นาโนเมตร โดยใช้ kojic acid ความเข้มข้นสุดท้าย 30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็น positive control เมื่อได้ค่า OD นำไปหาค่า % inhibition ดังสมการ (2) (Momtaz *et al.*, 2008)

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(\text{Absorbance } 475 \text{ Control} - \text{Absorbance } 475 \text{ Sample}) \times 100}{\text{Absorbance } 475 \text{ Control}}$$

3.4.6 การทดสอบฤทธิ์ต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส

ในการทดสอบนี้ทำขึ้นเพื่อเป็นการทดสอบฤทธิ์เบื้องต้นว่าตัวอย่างคีเฟอร์มีผลในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสหรือไม่ โดยนำตัวอย่างคีเฟอร์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มาใส่ลงใน 96 well plate ที่มีเอนไซม์อยู่ในปริมาณ 20 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายของ substrate L-DOPA ที่ละลายใน 0.1

โมลาร์ PBS pH 6.8 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 475 นาโนเมตร เมื่อได้ค่า OD นำไปหาค่า % inhibition ดังสมการ (Momtaz et al., 2008)

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(\text{Absorbance untreated group} - \text{Absorbance treated group})}{\text{Absorbance untreated group}} \times 100$$

3.4.7 การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

3.4.7.1 การเลี้ยงเซลล์

เซลล์ไลน์ชนิดเกาะ (adherent cell lines) ที่ใช้ในการศึกษา คือ เซลล์ปกติ HaCaT (Human HaCaT cells) ซึ่งเป็นเซลล์ผิวหนังชั้นบน นำเซลล์ HaCaT เลี้ยงในอาหารชนิด DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO & Invitrogen Corporation, USA) ที่ประกอบด้วย 10% fetal bovine serum (FBS, GIBCO & Invitrogen Corporation, USA), 1% penicillin-streptomycin (GIBCO & Invitrogen Corporation, USA) เซลล์ไลน์จะถูกเลี้ยงภายใต้ตู้บ่มที่สภาวะ 5% CO₂ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

3.4.7.2 การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT assay

วิธีการตรวจสอบทำได้โดยเลี้ยงเซลล์ HaCaT (Human keratinocyte HaCaT cells) ใน 96-wells plates เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมตัวอย่างเคีเฟอร์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ บ่มไว้ภายใต้สภาวะ 5% CO₂ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเติมสารละลาย MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ลงในแต่ละหลุม ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลาย MTT เป็น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นทำการบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูดเอาอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งไป แล้วละลายตะกอน Formazan dye โดยการเติม DMSO หลุมละ 200 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง และคำนวณ % cytotoxicity ดังสมการ

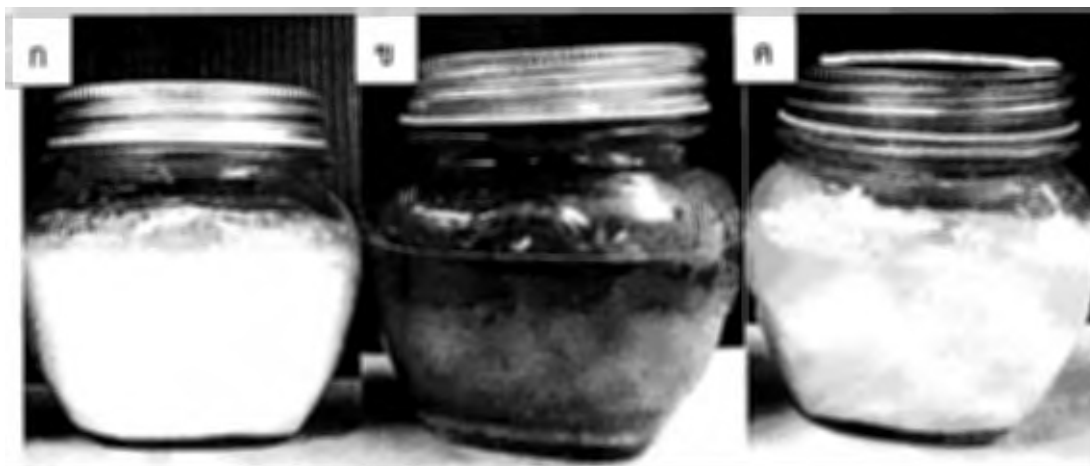
$$\% \text{ cytotoxicity} = \frac{(\text{Absorbance untreated group} - \text{Absorbance treated group})}{\text{Absorbance untreated group}} \times 100$$

บทที่ 4

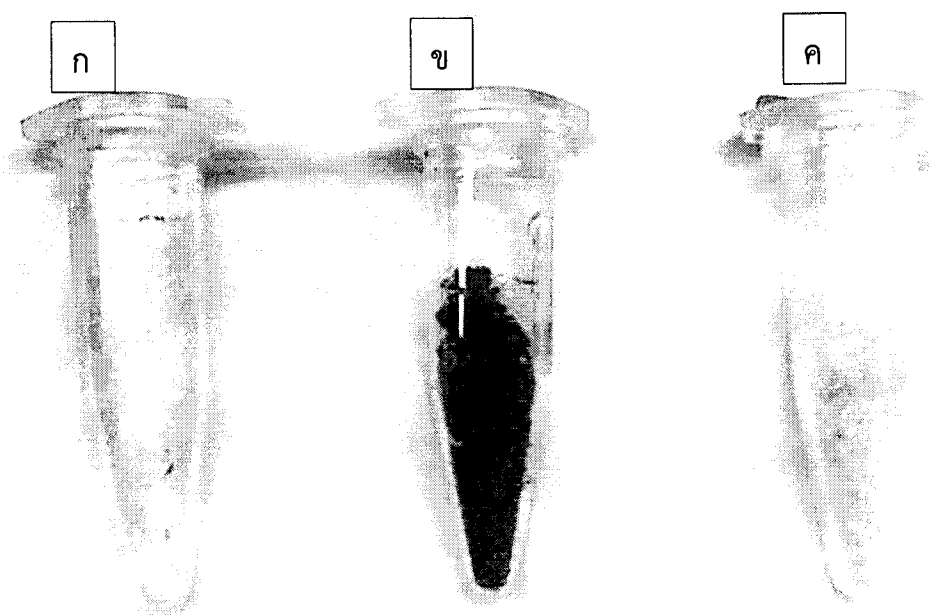
ผลการวิจัย

4.1 ลักษณะทางกายภาพของคิเฟอร์นมธัญพืชและน้ำหนักแห้ง

จากการทดสอบได้ทำการศึกษาลักษณะทางกายภาพของคิเฟอร์นมธัญพืช (ภาพที่ 4.1) และ น้ำหนักแห้งของคิเฟอร์นมธัญพืชทั้งสามชนิด คือ คิเฟอร์นมถั่วเหลือง ข้าวโพด และงาดำ (ภาพที่ 4.2) ได้ทำการศึกษาลักษณะของ กลิ่น การแยกชั้น ค่า pH ปริมาณความเป็นกรดของนมที่ผ่านการหมัก และปริมาณน้ำหนักแห้งของคิเฟอร์ตัวอย่าง เมื่อพิจารณาในเรื่องกลิ่น พบว่ากลิ่นของคิเฟอร์นมถั่วเหลืองจะมีกลิ่นเฉพาะตัวมีความแรงของกลิ่นในระดับปานกลาง ตั้งแต่ผ่านการหมักเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ขณะที่กลิ่นของคิเฟอร์นมข้าวโพดและงาดำมีกลิ่นเฉพาะตัวในระดับปานกลางเมื่อผ่านการหมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง และพบลักษณะการแยกชั้นของนมธัญพืชหมักเกิดขึ้นเมื่อผ่านการหมักเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ยกเว้นคิเฟอร์นมถั่วเหลืองเริ่มเกิดการแยกชั้นที่เวลาการหมักผ่านไป 48 ชั่วโมง จากการทดสอบค่า pH และปริมาณกรดทั้งหมดพบว่าคิเฟอร์นมข้าวโพดมีค่า pH ต่ำที่สุดและมีปริมาณกรดทั้งหมดสูงที่สุด ซึ่งทั้ง 2 ลักษณะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมักที่เพิ่มขึ้น ขณะที่คิเฟอร์นมถั่วเหลืองมีค่า pH และปริมาณกรดทั้งหมด ไม่แปรผันตามเวลาการหมัก โดยลดลงที่ระยะเวลาการหมักที่ 48 ชั่วโมง และเพิ่มขึ้นที่เวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณกรดทั้งหมด ส่วนคิเฟอร์นมงาดำ ค่า pH เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการหมักเพิ่มขึ้น ขณะที่ปริมาณกรดทั้งหมดเพิ่มขึ้นที่ 48 ชั่วโมง และลดลงที่ 72 ชั่วโมง แต่อย่างไรก็ตามปริมาณกรดที่ขึ้นลงนั้นไม่มีความแตกต่างกันมากนักอยู่ในช่วง 0.21-0.23% ในส่วนของน้ำหนักแห้ง คิเฟอร์นมข้าวโพดให้ปริมาณน้ำหนักแห้งมากที่สุดรองลงมา เป็นคิเฟอร์นมถั่วเหลืองและน้อยที่สุดเป็นคิเฟอร์นมงาดำ แสดงดังตารางที่ 4.1



ภาพที่ 4.1 ลักษณะของ ก) คีเฟอร์นมถั่วเหลือง ข) คีเฟอร์นมงาดำ และ ค) คีเฟอร์นมข้าวโพด



ภาพที่ 4.2 ลักษณะของ ก) คีเฟอร์นมถั่วเหลือง ข) คีเฟอร์นมงาดำ และ ค) คีเฟอร์นมข้าวโพด ที่ผ่านการทำแห้ง

ตารางที่ 4.1 ลักษณะทางกายภาพของคีเฟอร์นมธัญพืชหมักและน้ำหนักแห้ง

ชนิดของคีเฟอร์	กลิ่นนมธัญพืชหมัก	การแยกชั้น	pH หลังหมัก	ปริมาณกรด (%)	น้ำหนักแห้ง (g/100 ml)
นมถั่วเหลืองที่ 24 ชั่วโมง	++	×	4.82	0.39	0.66
นมข้าวโพดที่ 24 ชั่วโมง	+	✓	3.86	0.90	1.44
นมงาดำที่ 24 ชั่วโมง	+	✓	4.61	0.21	0.50
นมถั่วเหลืองที่ 48 ชั่วโมง	++	✓	4.60	0.68	0.74
นมข้าวโพดที่ 48 ชั่วโมง	+	✓	3.70	1.13	0.99
นมงาดำที่ 48 ชั่วโมง	+	✓	4.75	0.23	0.62
นมถั่วเหลืองที่ 72 ชั่วโมง	++	✓	4.86	0.34	0.82
นมข้าวโพดที่ 72 ชั่วโมง	++	✓	3.61	1.13	1.47
นมงาดำที่ 72 ชั่วโมง	++	✓	4.90	0.21	0.55
นมถั่วเหลืองไม่ผ่านการหมัก	-	-	-	-	2.49
นมข้าวโพดไม่ผ่านการหมัก	-	-	-	-	1.47
นมงาดำไม่ผ่านการหมัก	-	-	-	-	0.20

หมายเหตุ + หมายถึง ระดับความแรงของกลิ่น
 - หมายถึง ไม่ได้ทำการทดสอบ
 ✓ หมายถึง มีการแยกชั้น
 × หมายถึง ไม่มีการแยกชั้น

4.2 ผลทดสอบการยับยั้งเชื้อ *Propionibacterium acnes* ด้วยวิธี agar well diffusion

ผลทดสอบการยับยั้งเชื้อ *P. acnes* ด้วยวิธี agar well diffusion ของคีเฟอร์นมธัญพืชพบว่า ในระยะเวลาการหมักที่ 24 ชั่วโมง คีเฟอร์นมถั่วเหลืองไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *P. acnes* ได้ และ คีเฟอร์นมงาดำสามารถยับยั้งเชื้อได้ที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ขึ้นไป ขณะที่คีเฟอร์นมข้าวโพดเกิดความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *P. acnes* ได้ที่ระยะเวลาการหมักที่ 72 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เพียงอย่างเดียว นอกจากนั้นนมธัญพืชที่ไม่ได้ผ่านการหมักไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *P. acnes* ได้ แสดงให้เห็นว่าระยะเวลาการหมักที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ความสามารถใน

การยับยั้งเชื้อ *P. acnes* เพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับระดับความเข้มข้นที่ระดับความเข้มข้นที่สูงที่สุด 250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ให้ความสามารถในการยับยั้งเชื้อได้สูงสุด โดยในระยะเวลาการหมักที่ 72 ชั่วโมง ที่ระดับความเข้มข้น 250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร คีเฟอร์นมงาดำมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *P. acnes* ได้สูงสุด โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสเท่ากับ 14.67 ± 0.58 มิลลิเมตร รองลงมาคือคีเฟอร์นมถั่วเหลืองและคีเฟอร์นมข้าวโพด (11.50 ± 0.00 และ 9.00 ± 0.00 มิลลิเมตร ตามลำดับ) ดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ผลการยับยั้งเชื้อ *P. acnes* ของคีเฟอร์นมธัญพืช

ชนิดของคีเฟอร์	ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone (mean \pm SD) (mm)		
	ความเข้มข้น 50 (mg/ml)	ความเข้มข้น 100 (mg/ml)	ความเข้มข้น 250 (mg/ml)
นมถั่วเหลืองที่ 24 ชั่วโมง	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง
นมถั่วเหลืองที่ 48 ชั่วโมง	7.00 ± 0.00	8.00 ± 0.00	10.00 ± 0.00
นมถั่วเหลืองที่ 72 ชั่วโมง	8.00 ± 0.00	9.00 ± 0.00	11.50 ± 0.00
นมข้าวโพดที่ 24 ชั่วโมง	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง
นมข้าวโพดที่ 48 ชั่วโมง	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง
นมข้าวโพดที่ 72 ชั่วโมง	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง	9.00 ± 0.00
นมงาดำที่ 24 ชั่วโมง	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง
นมงาดำที่ 48 ชั่วโมง	ไม่ยับยั้ง	7.00 ± 0.00	11.50 ± 0.50
นมงาดำที่ 72 ชั่วโมง	8.67 ± 0.29	11.50 ± 0.50	14.67 ± 0.58
นมถั่วเหลืองไม่ผ่านการหมัก	-	-	ไม่ยับยั้ง
นมข้าวโพดไม่ผ่านการหมัก	-	-	ไม่ยับยั้ง
นมงาดำไม่ผ่านการหมัก	-	-	ไม่ยับยั้ง
Ampicillin (100 μ g/ml)	30.67 ± 0.57	30.67 ± 0.57	30.67 ± 0.57
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่ได้ทำการทดสอบ

4.3 ผลทดสอบการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ด้วยวิธี agar well diffusion

เมื่อนำคีเฟอร์นมธัญพืชทั้ง 3 ชนิด มาทดสอบการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* พบว่า คีเฟอร์นมข้าวโพดมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อได้ทุกช่วงเวลาการหมัก รวมทั้งนมข้าวโพดที่ไม่ผ่านการหมักก็มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสเท่ากับ 9.00 ± 0.00 มิลลิเมตร ขณะที่คีเฟอร์นมถั่วเหลืองให้ค่าการยับยั้งที่ระยะเวลาในการหมักที่ 72 ชั่วโมง เท่านั้น ส่วนคีเฟอร์นมงาดำทุกช่วงเวลาการหมักไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ จะเห็นได้ว่าความสามารถในการยับยั้งจะแปรผันตรงกับความเข้มข้นและระยะเวลาในการหมัก โดยคีเฟอร์นมข้าวโพดในระยะเวลาการหมักที่ 72 ชั่วโมง ที่ระดับความเข้มข้น 250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ให้ความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* มากที่สุด โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสเท่ากับ 25.00 ± 1.00 มิลลิเมตร ดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ผลการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ของคีเฟอร์นมธัญพืช

ชนิดของคีเฟอร์	ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone (mean \pm SD)		
	(mm)		
	ความเข้มข้น 50 (mg/ml)	ความเข้มข้น 100 (mg/ml)	ความเข้มข้น 250 (mg/ml)
นมถั่วเหลืองที่ 24 ชั่วโมง	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง
นมถั่วเหลืองที่ 48 ชั่วโมง	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง
นมถั่วเหลืองที่ 72 ชั่วโมง	10.67 ± 1.15	10.33 ± 0.57	12.00 ± 0.00
นมข้าวโพดที่ 24 ชั่วโมง	7.00 ± 1.00	9.67 ± 0.57	16.00 ± 1.00
นมข้าวโพดที่ 48 ชั่วโมง	9.00 ± 0.00	11.67 ± 0.57	19.00 ± 1.00
นมข้าวโพดที่ 72 ชั่วโมง	11.00 ± 1.00	16.33 ± 1.528	25.00 ± 1.00
นมงาดำที่ 24 ชั่วโมง	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง
นมงาดำที่ 48 ชั่วโมง	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง
นมงาดำที่ 72 ชั่วโมง	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง
นมถั่วเหลืองไม่ผ่านการหมัก	-	-	ไม่ยับยั้ง
นมข้าวโพดไม่ผ่านการหมัก	-	-	9.00 ± 0.00
นมงาดำไม่ผ่านการหมัก	-	-	ไม่ยับยั้ง
Ampicillin (100 μ g/ml)	34.67 ± 0.57	34.67 ± 0.57	34.67 ± 0.57
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง	ไม่ยับยั้ง

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่ได้ทำการทดสอบ

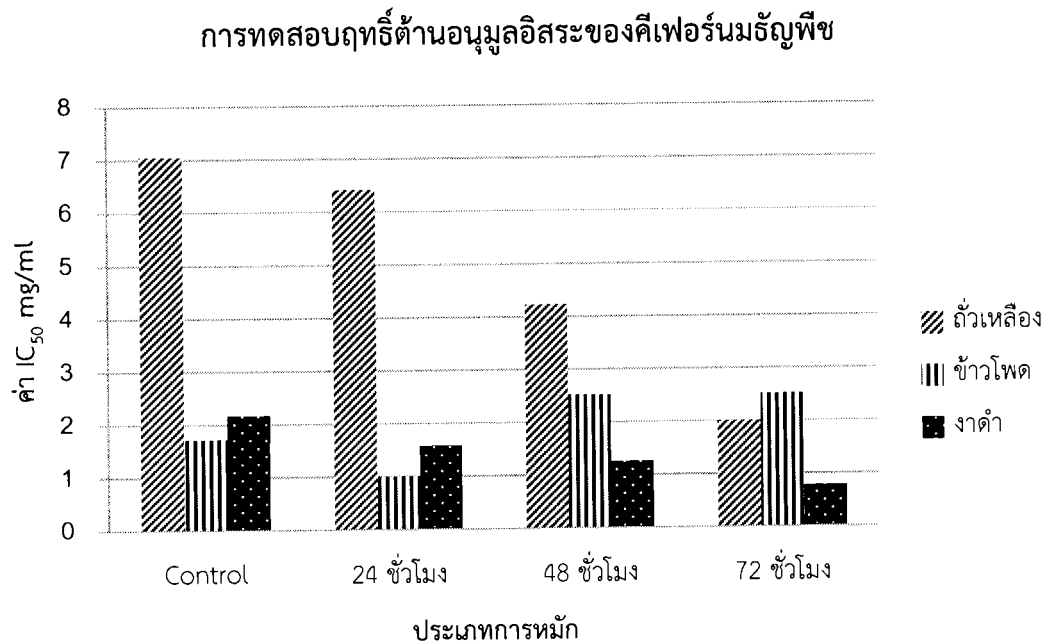
4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของคีเฟอร์นมธัญพืชด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของคีเฟอร์นมธัญพืชด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay จะรายงานอยู่ในค่าของ IC_{50} ซึ่งค่า IC_{50} คือค่าความเข้มข้นของสารทดสอบที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% โดยค่า IC_{50} ที่ต่ำจะแสดงถึงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่สูง จากการวิเคราะห์ค่า IC_{50} ของคีเฟอร์นมธัญพืชแต่ละชนิดพบว่า คีเฟอร์นมถั่วเหลืองและ คีเฟอร์นมงาดำมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้นเมื่อเทียบกับนมที่ไม่ได้ผ่านการหมัก และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้นแปรผันตรงกับระยะเวลาในการหมักที่เพิ่มขึ้น ซึ่งแตกต่างจากนมข้าวโพดที่ฤทธิ์จะต่ำลง เมื่อระยะเวลาในการหมักสูงขึ้น ผลการทดสอบพบว่า คีเฟอร์นมงาดำมีความสามารถในการเป็นต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดที่ระยะเวลาในการหมักผ่านไป 72 ชั่วโมง มีค่า IC_{50} อยู่ที่ 0.78 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ดังตารางที่ 4.4 และแสดงผลการเปรียบเทียบในลักษณะกราฟในภาพที่ 4.3

ตารางที่ 4.4 ผลค่า IC_{50} การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของคีเฟอร์นมธัญพืช

ชนิดของคีเฟอร์	IC_{50} * (mg/ml)			
	นมธัญพืชที่ไม่ผ่านการหมัก	หมักที่ 24 ชั่วโมง	หมักที่ 48 ชั่วโมง	หมักที่ 72 ชั่วโมง
นมถั่วเหลือง	7.04	6.41	4.23	2.00
นมข้าวโพด	1.72	1.00	2.51	2.51
นมงาดำ	2.16	1.57	1.26	0.78

*ค่า IC_{50} เกิดจากการพล็อตกราฟระหว่าง %inhibition เทียบกับความเข้มข้นของตัวอย่างคีเฟอร์โดยใช้ 4 ความเข้มข้นคือ 0.5, 5, 10 และ 15 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง



ภาพที่ 4.3 เปรียบเทียบการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของคีเฟอร์นมธัญพืช

4.5 ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไทโรซิเนสของคีเฟอร์นมธัญพืชที่ระดับความเข้มข้น 15 และ 30 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร พบว่าความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์เพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาการหมักและระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้น โดยที่ระยะเวลาในการหมักที่ 72 ชั่วโมง แสดงฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไทโรซิเนสได้สูงที่สุด คีเฟอร์นมข้าวโพดที่ได้จากการหมักเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง แสดงฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ได้สูงสุด มีค่าเท่ากับ $55.52 \pm 0.19\%$ ขณะที่คีเฟอร์นมถั่วเหลืองและงาดำมีค่าการยับยั้งใกล้เคียงกัน เท่ากับ $48.41 \pm 0.33\%$ และ $48.99 \pm 0.19\%$ ตามลำดับ ที่ระดับความเข้มข้น 15 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ตารางที่ 4.5)

ตารางที่ 4.5 ค่าการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไทโรซิเนสของคีเฟอร์นมธัญพืชที่ระยะเวลาการหมัก 24 48 และ 72 ชั่วโมง

ชนิดของคีเฟอร์	ความเข้มข้น (mg/ml)	ค่าการยับยั้ง (% \pm SD)
นมถั่วเหลืองที่ 24 ชั่วโมง	15	21.64 \pm 0.26
	30	41.49 \pm 0.22
นมข้าวโพดที่ 24 ชั่วโมง	15	14.65 \pm 0.16
	30	22.10 \pm 0.06
นมงาดำที่ 24 ชั่วโมง	15	27.03 \pm 0.21
	30	61.55 \pm 0.28
นมถั่วเหลืองที่ 48 ชั่วโมง	15	41.45 \pm 0.28
	30	44.35 \pm 0.34
นมข้าวโพดที่ 48 ชั่วโมง	15	24.71 \pm 0.18
	30	47.50 \pm 0.24
นมงาดำที่ 48 ชั่วโมง	15	40.56 \pm 0.32
	30	76.80 \pm 0.29
นมถั่วเหลืองที่ 72 ชั่วโมง	15	48.41 \pm 0.33
	30	90.46 \pm 0.17
นมข้าวโพดที่ 72 ชั่วโมง	15	55.52 \pm 0.19
	30	99.60 \pm 0.06
นมงาดำที่ 72 ชั่วโมง	15	48.98 \pm 0.19
	30	81.29 \pm 0.17
นมถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการหมัก	15	13.32 \pm 0.07
นมข้าวโพดที่ไม่ผ่านการหมัก	15	7.59 \pm 0.14
นมงาดำที่ไม่ผ่านการหมัก	15	19.12 \pm 0.29

4.6 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ HaCaT

ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ HaCaT ได้คัดเลือกคีเฟอร์นมธัญพืชที่ระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมง ไปใช้ในการทดสอบ เนื่องจากเป็นระยะเวลาการหมักที่ให้ฤทธิ์ทางชีวภาพที่ทำการศึกษาระดับสูงสุด และทำการทดสอบที่ระดับความเข้มข้นที่ 5 และ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

เนื่องจากที่ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นเป็นหมายที่ทำการทดสอบเนื่องจากเป็นความเข้มข้นที่พบฤทธิ์ทางชีวภาพที่ทำการศึกษา ส่วนที่ 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็นความเข้มข้นที่ทดสอบเพิ่มขึ้นมาเนื่องจากต้องการหาความเข้มข้นที่คาดว่าจะไม่เป็นพิษต่อเซลล์ HaCaT ผลการทดสอบพบว่าคีเฟอร์ธัญพืชทุกชนิดมีความเป็นพิษต่อเซลล์ HaCaT สูง ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร รวมทั้งคีเฟอร์นมข้าวโพดที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ส่วนคีเฟอร์นมถั่วเหลืองและนมงาดำมีความเป็นพิษต่อเซลล์ HaCaT ต่ำมาก โดยมีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์เท่ากับ 0.85 ± 1.38 และ $7.61 \pm 2.89\%$ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.6)

ตารางที่ 4.6 ความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ HaCaT ของคีเฟอร์ธัญพืชที่ระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมง

ชนิดของคีเฟอร์	ความเข้มข้น (mg/ml)	ค่าความเป็นพิษ (% \pm SD)
นมถั่วเหลือง	5	0.85 ± 1.38
	50	85.40 ± 3.06
นมข้าวโพด	5	70.87 ± 0.54
	50	99.32 ± 0.66
นมงาดำ	5	7.61 ± 2.89
	50	94.47 ± 0.37

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

การศึกษาคีเฟอร์นมธัญพืชที่ได้จาก ถั่วเหลือง ข้าวโพด และ งาดำ ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเกิดสิว 2 ชนิด คือ *P. acnes* และ *S. aureus* ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส และศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์เพื่อประโยชน์ในการประยุกต์ใช้เป็นผลิตภัณฑ์เวชสำอางค์ในอนาคต โดยทำการทดสอบหาเวลาหมักที่เหมาะสม ใช้ระยะเวลาในการหมัก 3 ช่วงเวลาด้วยกัน ได้แก่ 24 48 และ 72 ชั่วโมง เก็บข้อมูลลักษณะทางกายภาพของคีเฟอร์นมธัญพืชทั้ง 3 ชนิด รวมถึงน้ำหนักแห้ง เพื่อดูปริมาณการผลิตที่ได้ จากนั้นนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การทดสอบลักษณะทางกายภาพของคีเฟอร์นมธัญพืชและน้ำหนักแห้งพบว่ากลิ่นของคีเฟอร์นมถั่วเหลืองจะมีกลิ่นเฉพาะตัวที่มากกว่านมหมักชนิดอื่น หลังจากผ่านการหมักเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง โดยกลิ่นจะเท่ากันที่ระยะเวลาในการหมักที่ 72 ชั่วโมง การแยกชั้นของคีเฟอร์นมธัญพืชเกิดขึ้นเมื่อผ่านการหมักเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ยกเว้นคีเฟอร์นมถั่วเหลืองเริ่มเกิดการแยกชั้นที่เวลาการหมักผ่านไป 48 ชั่วโมง จากการทดสอบค่า pH และปริมาณกรดทั้งหมดพบว่าคีเฟอร์นมข้าวโพดมีค่า pH ต่ำที่สุดและมีปริมาณกรดทั้งหมดสูงที่สุด ในส่วนของน้ำหนักแห้ง คีเฟอร์นมข้าวโพดให้ปริมาณน้ำหนักแห้งมากที่สุดรองลงมาเป็นคีเฟอร์นมถั่วเหลืองและน้อยที่สุดเป็นคีเฟอร์นมงาดำ

เมื่อนำตัวอย่างคีเฟอร์นมธัญพืชมาทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเกิดสิวด้วยวิธี agar well diffusion พบว่าคีเฟอร์นมงาดำที่ระยะเวลาหมัก 72 ชั่วโมง ในความเข้มข้น 250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *P. acnes* ได้ดีที่สุด และในระยะเวลาในการหมักและที่ความเข้มข้นเดียวกันคีเฟอร์นมข้าวโพดสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ดีที่สุด

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของคีเฟอร์นมธัญพืช เมื่อเปรียบเทียบกับจากการวิเคราะห์ค่า IC_{50} ของคีเฟอร์นมธัญพืชแต่ละชนิดพบว่าคีเฟอร์นมงาดำมีฤทธิ์ในต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด ซึ่งมีค่า IC_{50} อยู่ที่ 0.78 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่ระยะเวลาในการหมัก 72 ชั่วโมง

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสพบว่าคีเฟอร์นมข้าวโพดที่ระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมง แสดงฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไทโรซิเนสได้สูงสุด มีค่าเท่ากับ $55.52 \pm 0.19\%$ และ $99.60 \pm 0.06\%$ ที่ระดับความเข้มข้น 15 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ 30 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์พบว่าคีเฟอร์นมธัญพืชที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีความเป็นพิษต่อเซลล์ HaCaT สูง ขณะที่ความเข้มข้นของคีเฟอร์นมธัญพืชที่ 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร คีเฟอร์นมถั่วเหลืองและคีเฟอร์นมงาดำแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ HaCaT ต่ำ

5.2 อภิปรายผล

เมื่อวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพของคีเฟอร์นมธัญพืชจากลักษณะของกลิ่นนม การที่นมมีกลิ่นที่เฉพาะตัวมากน้อยน่าจะขึ้นอยู่กับความแตกต่างของสารอาหารธัญพืชและการใช้สารอาหารของจุลินทรีย์ ส่วนการแยกชั้น ค่า pH หลังการหมักและปริมาณกรดทั้งหมด จะสอดคล้องกันเนื่องจากการแยกชั้นเกิดจากกรดที่ถูกสร้างขึ้นมาจากแบคทีเรียกรดแลคติกและกรดอะซิติก ทำให้นมเกิดการตกตะกอนเกิดการแยกชั้นได้ส่วนที่เป็นของเหลวและส่วนที่นมจับตัวกันเป็นก้อน ซึ่งค่า pH ที่ต่ำสอดคล้องกับปริมาณกรดที่สูง โดยกรดที่พบส่วนใหญ่จะเป็นกรด อะซิติกและกรดแลคติก ส่วนยีสต์จะสร้างแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์และแอลกอฮอล์เกิดขึ้น (วรรณดี แสงดี และคณะ, 2559; Pintado et al., 1996; Frengova et al., 2002) ปริมาณน้ำหนักรวมนั้นเป็นไปได้ว่าขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรตในธัญพืช เนื่องจากในน้ำนมธัญพืชจะมีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบหลัก โดยในเมล็ดถั่วเหลืองมีปริมาณของคาร์โบไฮเดรต 23.7 กรัม ต่อถั่วเหลือง 100 กรัม ในเมล็ดข้าวโพดหวานมีปริมาณของคาร์โบไฮเดรต 39.3 กรัม ต่อข้าวโพดหวาน 100 กรัม ส่วนในเมล็ดงาดำมีปริมาณของคาร์โบไฮเดรต 15.3 กรัม ต่อเมล็ดงาดำ 100 กรัม (Namiki, 1995) ซึ่งจะเห็นได้ว่านมหมักข้าวโพดมีปริมาณน้ำหนักรวมที่สูงที่สุด

จากการทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางผิวหนังที่ทำให้เกิดสิวด้วยวิธี agar well diffusion พบว่าตัวอย่างคีเฟอร์นมธัญพืชบางชนิดไม่สามารถยับยั้งเชื้อบางชนิดได้หรือยับยั้งได้แต่ให้ความสามารถที่สูงต่ำแตกต่างกัน ซึ่งคุณสมบัติในการเป็นสารต้านแบคทีเรียในคีเฟอร์นมธัญพืชอาจมีผลมาจากในระหว่างกระบวนการหมักนมธัญพืชกับหัวเชื้อคีเฟอร์จะมีการผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย เช่น กรดอินทรีย์ คีเฟอร์เรน แบคทีเรียโอซิน และ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยอื่น ๆ (Maeda et al., 2004; Medrano et al., 2008; Murofushi et al., 1983; Rodrigues et al., 2005; Vinderola et

al., 2006; Deeseenthum and Pejovic, 2010; Powell, 2006) และผลยับยั้งเชื้อแบคทีเรียส่วนหนึ่งมาจากสารในธัญพืชเอง เช่น ในข้าวโพดที่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้โดยไม่ผ่านการหมัก นอกจากนี้จากผลการศึกษาดังกล่าวนั้นแสดงให้เห็นว่าผลของระยะเวลาในการหมักที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบเพิ่มขึ้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ (Kim et al., 2016) ที่ได้ศึกษาในเรื่องระยะเวลาในการหมักมีผลต่อฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระพบว่าธัญพืชทั้ง 3 ชนิด มีสารที่มีคุณสมบัติที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น ในถั่วเหลืองจะมีสารไอโซฟลาโวนส์ (isoflavones) ปริมาณสูงสารนี้จัดอยู่ในกลุ่มสารฟีนอลิกซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Schryver, 2002) ในข้าวโพดจะมีสารกลุ่มแอลฟาแคโรทีน (α -carotenes) เบตาแคโรทีน (β -carotenes) ลูทีน (lutein) และซีแซนทีน (zeaxanthin) ปริมาณ 60 60 520 และ 437 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักข้าวโพด 100 กรัม ตามลำดับ (วรรณดี แสงดี และคณะ, 2559) และในงาคำจะมีสารต้านอนุมูลอิสระกลุ่ม ลิกแนน (lignans) ที่สำคัญ 2 ชนิด ได้แก่ สารเซซามิน (sesamin) และ เซซามอลิน (sesamol) (ชนิดา ปโชติการ, 2548) ซึ่งเมื่อนำธัญพืชทั้ง 3 ชนิด มาทำการหมักกับหัวเชื้อคีเฟอร์เมื่อผ่านกระบวนการหมักฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของนมธัญพืชหมักนั้นเพิ่มขึ้น ซึ่งได้สอดคล้องกับงานวิจัยที่มีรายงานก่อนหน้านี้ Deeseenthum and Pejovic (2010) รายงานว่าคีเฟอร์ที่หมักในน้ำนมข้าวขาวดอกมะลิ 105 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าคีเฟอร์ที่หมักด้วยนมวัว John and Sirirat (2014) รายงานว่าคีเฟอร์เพิ่มฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในข้าว 3 สายพันธุ์ ได้แก่ ข้าวเจ้ามะลิแดง ข้าวเหนียวดำ มข และข้าวเหนียวกล้าเปลือกดำ ในส่วนของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่เพิ่มขึ้นนั้นเกิดจากการที่ในตัวของคีเฟอร์นั้นมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอยู่และเมื่อผ่านกระบวนการหมักองค์ประกอบบางอย่างของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในคีเฟอร์จะถูกถ่ายโอนไปยังน้ำนมที่ใช้ในการหมักจึงทำให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น (Liu, et al., 2005) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่เพิ่มขึ้นนั้นเกิดจากการที่เมื่อผ่านกระบวนการหมักจุลินทรีย์ที่อยู่ในคีเฟอร์จะไปทำการย่อยโปรตีนในน้ำนมที่ใช้ในการหมักซึ่งกลายเป็นเปปไทด์สายสั้น ๆ ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจึงทำให้ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระนั้นเพิ่มขึ้น (Deeseenthum and Pejovic, 2010)

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไทโรซิเนสของคีเฟอร์นมธัญพืชเพื่อนำไปสู่ผิวขาวกระจ่างใส อาจเป็นไปได้ว่าความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไทโรซิเนสของคีเฟอร์เกิดจากองค์ประกอบของเปปไทด์ และกรดแลคติกซึ่งเป็นสารที่แบคทีเรียกลุ่มแลคติกในคีเฟอร์ผลิตขึ้นในระหว่างการหมักนม ดังรายงานในการศึกษาฤทธิ์ของคีเฟอร์นมแพะ และจากการทดสอบใช้คีเฟอร์เวย์กรดแลคติก และเปปไทด์ ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่าสามารถยับยั้งการทำงานของ

เอนไซม์ไทโรซิเนสได้โดยผ่านกลไกการจับกับคอปเปอร์ (Cu) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ไทโรซิเนส ทำให้เอนไซม์เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไป จึงสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ (Chen et al., 2006; Usuki et al., 2003)

ความเป็นพิษต่อเซลล์ HaCaT พบว่าคีเฟอร์นมธัญพืชทั้งหมดมีความเป็นพิษต่อเซลล์ทดสอบในความเข้มข้นที่ให้ฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งเป็นผลในเชิงลบต่อการนำมาใช้พัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์รักษาผิว อย่างไรก็ตามการใช้สำหรับเวชสำอางค์ในการป้องกันผิว ความหอมกลิ่นและต่อต้านอนุมูลอิสระมีความเป็นไปได้แต่ควรทำการทดสอบเรื่องของความเข้มข้นที่ใช้และความเป็นพิษหรือการระคายเคืองต่อผิวเพิ่มเติม อีกแนวทางหนึ่งควรทำการแยกสารออกฤทธิ์ออกจากคีเฟอร์ซึ่งอาจลดความเป็นพิษต่อเซลล์ลง

5.3 ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อที่เป็นสาเหตุของการก่อสิว ควรมีการทดสอบหาค่า MIC และ MBC เพิ่มเติม และการนำคีเฟอร์นมธัญพืชแต่ละชนิดมาผสมกันในการหมักกับหัวเชื้อคีเฟอร์เป็นที่น่าสนใจเพื่อคาดหวังการเสริมฤทธิ์กันของธัญพืชชนิดต่าง ๆ รวมทั้งการบ่งบอกรายออกฤทธิ์ สารเมตาบอไลต์ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการของจุลินทรีย์ในคีเฟอร์ นอกจากนี้ฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น หรือการทดสอบในสัตว์ทดลอง ก็เป็นที่น่าสนใจในการทำวิจัยในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

- กองโภชนาการ กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข. 2530. **ตารางแสดงคุณค่าอาหารไทยในส่วนที่กินได้ 100 กรัม**. กระทรวงสาธารณสุข. กรุงเทพฯ.
- จิราภรณ์ บุราคร และเรื่อนแก้ว ประพฤติ. (2555). ผลของสารสกัดสมุนไพรพื้นบ้านไทยจำนวน 7 ชนิด ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย. **วารสารการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก ปีที่ 10 ฉบับที่ 1 มกราคม – เมษายน 2555**.
- จิรวาส ประทุมวัน, จิราภรณ์ บุญเงิน, นพัตสร่า บุญปอง, นริศรา ธรรมทวีโชค, พัชรสุญา ไกรศรีพันธุ์, อรณิชา สันทวีวรกุล, ชมพูนุท สันตุพิบูลยกิจ, ภาวดี ช่วยเจริญ, ปานทิพย์ รัตนศิลป์กุลชาญ และ อิสยา จันทร์วิทยานุชิต. (2558). **ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในผลิตภัณฑ์นมถั่วเหลืองสูตรดั้งเดิมและนมถั่วเหลืองผสมงาดำ**. รายงานการประชุมวิชาการนำเสนอผลการวิจัยระดับชาติและนานาชาติ กลุ่มระดับชาติด้านวิทยาศาสตร์.
- ชนิดา โพธิ์การ และคณะ. (2548). **อาหาร & สุขภาพ (พิมพ์ครั้งที่ 1)**. กรุงเทพฯ: เสริมมิตร.
- นวลนภา อัครสินธวัจกุล. (2546). **การผลิตโยเกิร์ตน้ำนมข้าวโพด**. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เรณู โคตรจรัส. (2544). **สิวในปรียากุลละวณิชย์&ประวิตรพิศาลบุตร (บรรณาธิการ).โรคผิวหนังในเวชปฏิบัติ 2. (หน้า 1-13)**. กรุงเทพฯ: หมอชาวบ้าน.สถาบันโรคผิวหนัง. (2551).
- วรรณดี แสงดี, สุรัตน์ วงพิกุล, ปรียาภรณ์ อิศรานูวัฒน์. (2559). **การพัฒนาผลิตภัณฑ์น้ำนมหมักข้าวโพดซินไบโอติก**. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ.
- สถาบันโรคผิวหนัง. (2551). **สถิติโรคของสถาบันโรคผิวหนังปีประจำปี 2551**. ค้นเมื่อ 6 สิงหาคม 2552, จาก www.inderm.go.th/nuke_802/modules.php?name=Forums&file=viewtopic&t=286.
- โอภา วัชระคุปต์. (2550). **สารต้านอนุมูลอิสระ**. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: นิเวศมิตรการพิมพ์.
- Agar, N. and Young, A.R. (2005). Melanogenesis: a photoprotective response to DNA damage?. *Mutation Research*, 571, 121–132.
- Ando, H., Kondoh, H., Ichihashi, M. and Hearing, V.J. (2007). Approaches to identify inhibitors of melanin biosynthesis via the quality control of tyrosinase. *Journal of Investigative Dermatology*, 127(4), 751-761.
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2005). Phenolic compounds in plants and

- agriindustrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, 99: 191-203.
- Briganti, S., Camera, E. and Picardo, M. (2003). Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation. **Pigment Cell Research**, 16(2), 101-110.
- Cheeseman, K.H. and Slater, T.F. (1993). Free radical in medicine. **Churchill Livingstone**. London.
- Chen, M.J., Liu, J.R., Sheu, J.F., Lin, C.W. and Chuang, C.L. (2006). Study on Skin Care Properties of Milk. **Asian Australasian Journal of Animal Sciences**, 19(6), 905-908.
- Deeseenthum, S. and Pejovic, J. (2010). Bacterial inhibition and antioxidant activity of kefir produced from Thai Jasmine rice milk. **Biotechnology**, 9(3), 332-337.
- Farnworth, E.R. (1999). Kefir: from folklore to regulatory approval. **Journal of Nutraceuticals, Functional & Medical Foods**, 1, 57-68.
- Farnworth, E.R. and Mainville, I. (2003). Kefir: A fermented milk product. Hand book of Fermented Functional Foods. E. R. Farnworth, editor. **CRC Press**, London, U.K., pp. 77-112.
- Farnworth, E.R. (2005). Kefir- a complex probiotic. **Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods**, 2:1-17.
- Frengova, G., Emilina, I., Simovaa, D., Beshkovaa, D.M. and Simovb, Z.I. (2002). Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria of Kefir Grains Z. **Naturforsch**, 57, 805-810.
- Galván, I. and Alonso-Alvarez, C. (2009). The expression of melanin-based plumage is separately modulated by exogenous oxidative stress and a melanocortin. **Proceedings of the Royal Society B**, 276, 3089-3097.
- Gupta, A.K., Gover, M.D., Nouri, K., and Taylor, S. (2006). The treatment of melasma: a review of clinical trials. **Journal of the American Academy of Dermatology**, 55(6), 1048-1065.
- John, S.M. and Sirirat, D. (2014). Antioxidant activities and total phenolic contents of colored rice milk kefir with and without UHT milk addition. The 16th food innovation Asia conference 2014: Science and innovation for quality of life, 13.
- Klaenhammer, T.R. (1998). "Bacteriocin of lactic acid bacteria," **Biochimie**, 70, 337-349.

- Kim, Y.J., and Uyama, H. (2005). Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 62(15), 1707-1723.
- Liu, J.R., Chen, M.J. and Lin, C.W. (2005). Antimutagenic and antioxidant properties of milk-kefir and soymilk-kefir. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53(7), 2467-2474.
- Maeda, H., Zhu, X., Omura, K., Suzuki, S., and Kitamura, S. (2004). Structural characterization and biological activities of an exopolysaccharide kefiran produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* WT-2B(T). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52, 5533-5538.
- Mascarher, T.N., Margulis, G. Wang, T, Ye, R.W. and Helmann, J.D. (2003). Cell wall stress response in *Bacillus subtilis*: the regulatory network of the bacitracin stimulon. **Mol. Microbiology**, 50, 1591-1604.
- Mason P. (2011). **Dietary Supplements**. Fourth ed. London: Pharmaceutical Press.
- Medrano, M., Pe´ rez, P.F. and Abraham, A.G. (2008). Kefiran antagonizes cytopathic effects of *Bacillus cereus* extracellular factors. **International Journal of Food Microbiology**, 122, 1-7.
- Messina, M.J., Persky, V., Setchell, K.D. (1994). Soy intake and cancer risk: a review of the in vitro and in vivo data. **Nutrition and Cancer**, 21, 113-31.
- Momtaz, S., Mapunya, B.M., Houghton, P.J., Edgerly, C., Hussein, A., Naidoo, S., and Lall, N. (2008). Tyrosinase inhibition by extracts and constituents of *Sideroxylon inerme* stem bark, used in South Africa for skin lightening. **Journal of Ethnopharmacology**, 119(3), 507-512.
- Murofushi, M., Shiomi, M., and Aibara, K. (1983). Effect of orally administered polysaccharide from kefir grain on delayed-type hypersensitivity and tumor growth in mice. **Japanese Journal of Medical Science & Biology**, 36(1), 49-53.
- Namiki M, (1995). The Chemistry and Physiological Functions of Sesame. **Food Reviews International**, 11(2), 281-329.
- Papus, A.M. (1998). Antioxidant Status, Diet, Nutrient and Health. **CRC Press LLC**. London.

- Pillai, S., Oresajo, C., and Hayward, J. (2005). Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation - a review. **International Journal of Cosmetic Science**, 27(1), 17-34.
- Pintado, M.E., Lopes, D.a., Silva, J.A., Fernandes, P.B., Malcata, F.X. and Hogg, T.A. (1996). Microbiological and rheological studies on Portuguese Kefir grains. **Int. Journal of Food Science and Technology**, 31, 15-26.
- Powell, J.E. (2006). **Bacteriocins and Bacteriocin producers present in kefir and kefir grains. Thesis Master of Science in food science.** Department of Food Science, Faculty of Agriscience. Stellenbosch University.
- Rekha, C. and Vijayalakshmi, G. (2008). Biomolecules and Nutritional Quality of Soymilk Fermented with Probiotic Yeast and Bacteria. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 151, 452-463.
- Roberfroid, M. and Calderon, P.B. (1995). Biologically relevant radicals. In: Roberfroid M, Calderon PB, editors. **Free radicals and oxidation phenomena in biological systems.** New York: Marcel Dekker Inc, 33-90.
- Rodrigues, K.L., Gaudino Caputo, L.R., Tavares Carvalho, J.C., Evangelista, J. and Schneedorf, J.M. (2005). Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. **International Journal of Antimicrobial Agents**. 25, 404-408.
- Schryver, T. (2002). Increasing health benefits using soy germ. **Cereal foods world**, 47(5), 185-8.
- Silvia V, Angela A, Stefano M. (2004). The Antioxidants and Pro-Antioxidants Network: An Overview. **Current Pharmaceutical Design**. 10(14), 1677-94.
- Solano, F., Briganti, S., Picardo, M. and Ghanem, G. (2006). Hypopigmenting agents: an updated review on biological, chemical and clinical aspects. **Pigment Cell Research**, 19(6), 550-571.
- Srisayam, M., and Chantawannakul, P. (2010). Antimicrobial and antioxidant properties of Thai honeys produced by *Apis mellifera* in Thailand. **Journal of ApiProduct and ApiMedical Science**, 2 (2), 77-83.
- Stiles, M.E. and Hasting, J.W. (1991). Bacteriocin production by Lactic Acid Bacteria: Potential for Use in Meat Preservation. **Trends in food Science and**

Technology, 2(10), 247-251.

United States Department of Agriculture. (2019). Basic Report: 11167, Corn, sweet, yellow, raw. **USDA National Nutrient Database for Standard Reference Legacy Release**. ค้นเมื่อ 8 พฤษภาคม 2562, จาก<https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/2932>.

Usuki, A., Ohashi, A., Sato, H., Ochiai, Y., Ichihashi, M. & Funasaka, Y. (2003). The inhibitory effect of glycolic acid and lactic acid on melanin synthesis in melanoma cells. **Experimental Dermatology**, 2, 43-50.

Vinderola, C.G., Duarte, J., Thangavel, D., Perdigon, G., Farnworth, E. and Matar, C. (2006). Effects of the oral administration of the products derived from milk fermentation by kefir microflora on immune stimulation. **Journal of Dairy Research**, 73(4), 472-9.

Wang, Y., Yu, R. and Chou, C. (2006). Antioxidative activities of soymilk fermented with lactic acid bacteria and bifidobacteria. **Food Microbiology**, 23, 128-135.

ภาคผนวก

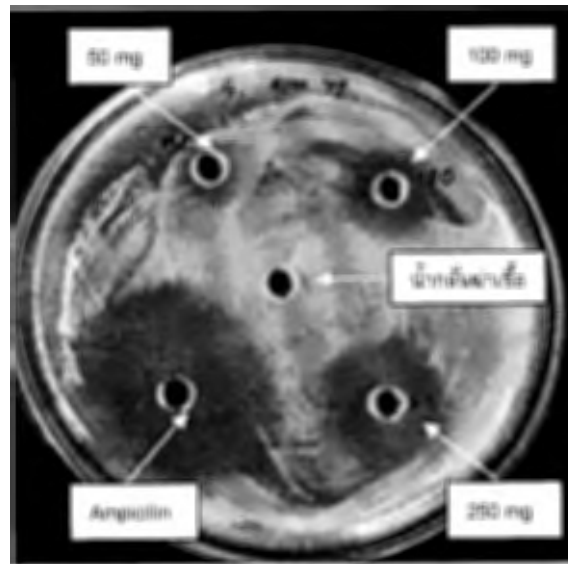
ภาคผนวก ก
ลักษณะของคีเฟอร์นมธัญพืชที่ใช้ในงานวิจัย



ภาพภาคผนวก ก ที่ 1 ลักษณะของหัวเชื้อคีเฟอร์ (kefir grain)

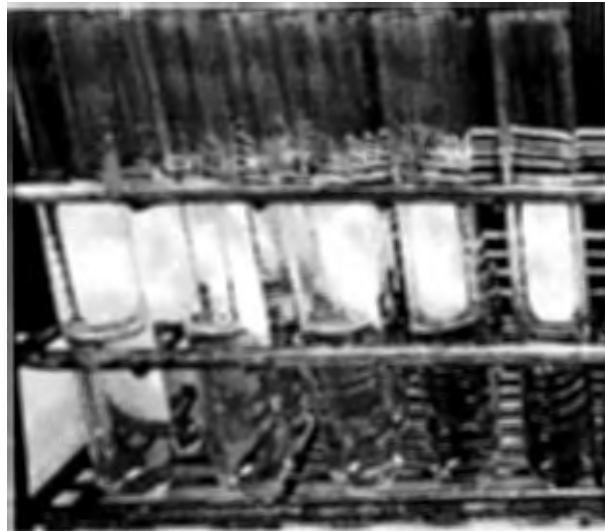
ภาคผนวก ข

ลักษณะการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจากการทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion



ภาพภาคผนวก ข ที่ 1 ลักษณะการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของคีเฟอร์นมธัญพืชเกิดขึ้นเป็นวงใสรอบหลุมบรรจุสารละลายคีเฟอร์ที่ระดับความเข้มข้น 50 100 และ 250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีน้ำกลั่นฆ่าเชื้อเป็นตัวควบคุมผลลบและ ampicillin เป็นสารควบคุมผลบวก

ภาคผนวก ค
ลักษณะการทดสอบ และผลการทดสอบ (% IC_{50}) ด้วยวิธี
DPPH radical scavenging assay



15 mg/ml 10 mg/ml 5 mg/ml 0.1 mg/ml ความเข้มข้นของคีเฟอร์

ภาพภาคผนวก ค ที่ 1 ลักษณะการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของคีเฟอร์นมธัญพืช ซึ่งเปลี่ยนสารละลาย DPPH จากสีม่วงเป็นสีส้มเหลือง ตามระดับความเข้มข้นของคีเฟอร์เพิ่มขึ้น

ตารางภาคผนวก ค ที่ 1 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของคีเฟอร์นมธัญพืช

ชนิดนม	ความเข้มข้น (mg/ml)	ค่าเฉลี่ย (%inhibition \pm SD)	IC50 (mg/ml)
control ถั่วเหลือง	5	44.845 \pm 0.344	7.040693
	10	58.190 \pm 0.694	
	15	70.848 \pm 0.552	
	20	87.310 \pm 0.694	
control ข้าวโพด	0.5	45.924 \pm 0.135	1.720057
	5	57.340 \pm 0.690	
	10	80.656 \pm 0.457	
	15	86.125 \pm 0.498	
control งาดำ	1	49.466 \pm 0.092	1.577496
	5	59.348 \pm 0.245	
	10	69.925 \pm 0.370	
	15	88.408 \pm 0.092	
ถั่วเหลือง 24 ชั่วโมง	1	23.943 \pm 0.503	6.413913
	5	45.195 \pm 0.343	
	10	68.644 \pm 0.343	
	15	85.942 \pm 0.190	
ข้าวโพด 24 ชั่วโมง	0.5	39.493 \pm 0.207	1.001229
	5	73.472 \pm 0.469	
	10	86.649 \pm 0.327	
	15	90.941 \pm 0.199	
งาดำ 24 ชั่วโมง	0.5	40.760 \pm 0.136	2.165804
	5	63.372 \pm 0.271	
	10	79.714 \pm 0.225	
	15	90.854 \pm 0.075	
ถั่วเหลือง 48 ชั่วโมง	1	32.290 \pm 0.165	4.231171
	5	57.990 \pm 0.594	
	10	76.771 \pm 0.285	
	15	88.248 \pm 0.252	
ข้าวโพด 48 ชั่วโมง	0.5	36.549 \pm 0.235	2.519394
	5	65.193 \pm 0.300	
	10	81.968 \pm 0.075	
	15	88.687 \pm 0.260	

ชนิดนม	ความเข้มข้น (mg/ml)	ค่าเฉลี่ย (%inhibition ± SD)	IC50 (mg/ml)
น้ำตาล 48 ชั่วโมง	0.5	40.987±0.207	1.261893
	5	69.839±0.255	
	10	87.980±0.289	
	15	94.825±0.167	
ถั่วเหลือง 72 ชั่วโมง	1	45.360±0.095	2.000546
	5	61.560±0.190	
	10	76.771±0.165	
	15	92.092±0.165	
ข้าวโพด 72 ชั่วโมง	1	44.042±0.252	2.518892
	5	58.320±0.571	
	10	75.837±0.666	
	15	87.699±0.530	
น้ำตาล 72 ชั่วโมง	0.1	39.674±0.136	0.785055
	5	74.451±0.229	
	10	93.762±0.312	
	15	99.052±0.229	

งานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์

บทความวิจัย

ฤทธิ์ทางชีวภาพของคีเฟอร์เวย์จากนมถั่วเหลืองและนมงาดำ Biological Properties of Kefir Whey Samples Produced from Soy and Black Sesame Milks

มนตรา ศรีชะแย้ม¹, เจนจิรา กลิ่นรัตน์¹ และ อรุณลักษณ์ โชตินาครินทร์²

Montra Srisayam¹, Janejira Klinrat¹ and Arunluk Chodnakarin²

¹สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

²สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

¹Microbiology Department, Faculty of Science and Technology, Pibulsongkram Rajabhat University

²Biotechnology Department, Faculty of Science and Technology, Pibulsongkram Rajabhat University

Received : 8 January 2018

Accepted : 7 June 2018

Published online : 2 July 2018

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของคีเฟอร์เวย์จากนมถั่วเหลืองและนมงาดำ ในการต่อต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไทโรซิเนส และยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อให้เกิดสิว (*Propionibacterium acnes* DMST 14916 และ *Staphylococcus aureus* DMST 8013) การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระใช้วิธี DPPH radical scavenging การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไทโรซิเนสใช้วิธี mushroom tyrosinase inhibition และทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียด้วยวิธี agar well diffusion ผลที่ได้พบว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของคีเฟอร์เวย์จากนมงาดำที่ระยะเวลาหมัก 72 ชั่วโมง มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงสุด มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 0.78 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ผลการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่าคีเฟอร์เวย์จากนมถั่วเหลืองทั้ง 2 ชนิด ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ใกล้เคียงกัน โดยคีเฟอร์เวย์จากนมถั่วเหลืองและนมงาดำที่ระยะเวลาหมัก 72 ชั่วโมง มี % inhibition เท่ากับ 48.41±0.33% และ 48.99±0.19% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพคีเฟอร์เวย์จากนมถั่วเหลืองและนมงาดำในการยับยั้งแบคทีเรีย พบว่าคีเฟอร์เวย์จากนมงาดำที่ระยะเวลาหมัก 72 ชั่วโมง (14.67±0.58 มิลลิเมตร) สามารถยับยั้งเชื้อ *P. acnes* DMST 14916 ได้ดีกว่าคีเฟอร์เวย์จากนมถั่วเหลืองที่ระยะเวลาหมัก 72 ชั่วโมง (11.50±0.00 มิลลิเมตร) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) คีเฟอร์เวย์จากนมถั่วเหลืองที่ระยะเวลาหมัก 72 ชั่วโมง สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* DMST 8013 ได้ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง เท่ากับ 12.00±0.00 มิลลิเมตร ที่ระดับความเข้มข้น 250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ขณะที่คีเฟอร์เวย์จากนมงาดำไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* DMST 8013 ได้นอกจากนี้พบว่าคีเฟอร์เวย์ทั้งสองชนิดมีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงขึ้นเมื่อระยะเวลาในการหมักเพิ่มขึ้น จากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า คีเฟอร์เวย์จากนมถั่วเหลืองและคีเฟอร์เวย์จากนมงาดำสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เวชสำอางได้

คำสำคัญ : คีเฟอร์, กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ, กิจกรรมยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส, ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย

*Corresponding author. E-mail : srisayam_ssy@psru.ac.th

Abstract

The aims of this study were to determine the antioxidant and the antityrosinase activities and to evaluate the inhibition of acne-inducing bacteria (*Propionibacterium acnes* DMST 14916 and *Staphylococcus aureus* DMST 8013) of kefir whey samples produced from soy and black sesame milk samples. The antioxidant capacity was measured using DPPH radical scavenging assay. The antityrosinase activity was tested based on mushroom tyrosinase inhibition assay. The antibacterial activity was carried out by agar well diffusion method. The results demonstrated that the black sesame milk kefir whey obtained from 72 h fermentation had the highest antioxidant activity with the IC_{50} values of 0.78 mg/ml. The antityrosinase activities from the soy and the black sesame milk kefir whey from 72 h fermentation were displayed in the same level ($48.41 \pm 0.33\%$ and $48.99 \pm 0.19\%$, respectively). Evaluation of antibacterial activity demonstrated that the inhibition of *P. acnes* DMST 14916 by the black sesame milk kefir whey obtained from 72 h fermentation (14.67 ± 0.58 mm) was significantly higher ($p < 0.05$) than that obtained from the soy milk kefir whey fermented at 72 h (11.50 ± 0.00 mm). The soy milk kefir whey fermented at 72 h was able to inhibit *S. aureus* DMST 8013 with inhibition zone of 12.00 ± 0.00 mm at the concentration of 250 mg/ml while the black sesame milk kefir whey could not inhibit *S. aureus* DMST 8013. In addition, it was found that the biological activities of two types of kefir whey were increased with the increasing of fermentation time. Based on results of this investigation, application of soy and black sesame milk kefir whey in cosmeceuticals is possible.

Keywords : Kefir, antioxidant activity, antityrosinase activity, antibacterial activity

บทนำ

ผลิตภัณฑ์นมหมัก (fermented milk products) เป็นผลิตภัณฑ์นมที่ผ่านการเปลี่ยนแปลงสภาพของนมโดยจุลินทรีย์เปลี่ยนน้ำตาลแลคโตสในนมให้เป็นกรดแลคติกและสารอื่นปริมาณเล็กน้อยในระหว่างกระบวนการหมัก เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ กรดอะซิติก อะเซตัลดีไฮด์ ซึ่งส่วนใหญ่เกิดจากแบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria) ผลิตภัณฑ์นมหมักเป็นอาหารประเภทหนึ่งที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย ช่วยในระบบขับถ่าย และยังเป็นประโยชน์สำหรับบุคคลที่แพ้โปรตีนในนมสัตว์ นอกจากนี้ยังมีวิตามินและแร่ธาตุหลายชนิด ผลิตภัณฑ์นมหมักที่เรารู้จักเป็นอย่างดี เช่น โยเกิร์ต ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติก ขณะที่ผลิตภัณฑ์นมหมักอีกชนิดหนึ่งที่มีกระจายอยู่ทั่วไปทั้งในประเทศและต่างประเทศแต่อาจไม่เป็นที่รู้จักของคนส่วนใหญ่ คือ คีเฟอร์ (kefir) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์นมหมักที่เกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์หลายชนิด ได้แก่ แบคทีเรียกรดแลคติก แบคทีเรียกรดอะซิติก (acetic acid bacteria) และยีสต์ (yeast) ทำให้ผลิตภัณฑ์นมหมักที่ได้มีองค์ประกอบของกรดแลคติก กรดอะซิติก แอลกอฮอล์เล็กน้อยและมีกลิ่นรสเฉพาะตัว จากรายงานพบว่าคีเฟอร์มีองค์ประกอบที่มีความสำคัญทางชีวภาพ ช่วยส่งเสริมสุขภาพและถือเป็นผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก (Farnworth *et al.*, 1999; Mascarher *et al.*, 2003)

บทความวิจัย

คีเฟอร์เป็นผลิตภัณฑ์นมหมักที่ส่วนใหญ่อยู่ในรูปของเครื่องดื่มนมหมัก ผลิตจากหัวเชื้อคีเฟอร์หรือกล้าเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ในรูปของเม็ดคีเฟอร์ (kefir grain) มีรายงานว่าคีเฟอร์สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ เนื่องจากความเป็นกรด และมีการผลิตแบคทีริโอซิน (bacteriocin) จากกลุ่ม lactic acid bacteria ซึ่งมีความปลอดภัยและเป็นประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมอาหารเพื่อใช้ในการถนอมอาหาร และใช้แทนสารปฏิชีวนะในผลิตภัณฑ์อาหารบางประเภทได้ (Cleveland *et al.*, 2001; da Silva Malheiros *et al.*, 2010) นอกจากนี้ยังมีผลดีต่อสุขภาพมากมาย โดยมีความสามารถเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้านการอักเสบ ต้านมะเร็ง ช่วยให้มีผิวขาวกระจ่างใสขึ้น และช่วยลดระดับคอเลสเตอรอล (Farnworth *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าจุลินทรีย์ในคีเฟอร์ช่วยเพิ่มฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระให้กับนมหมักทั้งที่มาจากสัตว์และจากพืชได้ (Wang *et al.*, 2006; Rekha & Vijayalakshmi, 2008) อย่างไรก็ตามในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของคีเฟอร์ส่วนใหญ่ศึกษาในน้ำนมสัตว์ เช่น นมวัว นมแพะ หรือการศึกษาในนมที่ผลิตจากพืช ที่พบส่วนใหญ่เป็นการศึกษาในนมถั่วเหลือง (Wang *et al.*, 2006; Rekha & Vijayalakshmi, 2008) แต่ยังไม่มีการศึกษาในธัญพืชอื่น ๆ อีกมากที่สามารถผลิตเป็นน้ำนมพืชได้ ซึ่งคาดว่าธัญพืชที่มีความน่าสนใจมาก เนื่องจากเป็นแหล่งแคลเซียมสูงจึงมีการนำธัญพืชเป็นองค์ประกอบของอาหารและเครื่องดื่มนมธัญพืช เป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งแบคทีเรียบางชนิดได้ เป็นเหตุให้มีการนำธัญพืชมาใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางในการดูแลผิวพรรณ (Srisayam *et al.*, 2014; Nigam *et al.*, 2015)

ดังนั้นจากข้อมูลดังกล่าวมาน่าจะเป็นไปได้ว่าการหมักนมที่ผลิตจากธัญพืชด้วยหัวเชื้อคีเฟอร์ช่วยเพิ่มฤทธิ์ทางชีวภาพให้สูงขึ้นได้ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไทโรซิเนสและฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้เกิดสิวจากคีเฟอร์เวย์จากนมถั่วเหลืองและนมถั่วดำ เพื่อประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เวชสำอางเนื่องจากเป็นที่ต้องการสูงในปัจจุบัน ที่เน้นการดูแลผิวพรรณ ไร้สิวและเพื่อผิวขาวกระจ่างใส

วิธีการดำเนินการวิจัย

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ

เชื้อที่ใช้ในการทดสอบได้มาจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ มี 2 ชนิด ดังนี้ คือ *Staphylococcus aureus* DMST 8013 และ *Propionibacterium acnes* DMST 14916

คีเฟอร์

คีเฟอร์ (Kefir cultures DC 1000 I (Danisco, Poland))

การเพาะเลี้ยงหัวเชื้อคีเฟอร์

ทำการกระตุ้นหัวเชื้อคีเฟอร์ ให้เจริญโดยใช้ผงคีเฟอร์ 1 กรัม ผสมให้เข้ากันกับนมพาสเจอร์ไรส์ปริมาตร 200 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมารองเพื่อเก็บเม็ดคีเฟอร์ (kefir grain) และเพิ่มจำนวน

บทควาามวิจัย

หัวเชื้อโดยใช้เมล็ดคิเฟอร์ 10 กรัม ต่อนมพาสเจอร์ไรส์ปริมาตร 200 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการกรองและเก็บเมล็ดคิเฟอร์ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อต่อไป

การเตรียมตัวอย่างคิเฟอร์เวย์ (kefir whey) จากนมถั่วเหลืองและนมยาคา

การทำงานธัญพืช เริ่มจากนำเมล็ดถั่วเหลืองและงาคั่ว อย่างละ 250 กรัม แช่น้ำไว้เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นให้เมล็ดแตกโดยการเติมน้ำลงไป 1,000 มิลลิลิตร (250 กรัม : 1,000 มิลลิลิตร) นำส่วนน้ำที่กรองได้ไปต้มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที พักให้เย็นจะได้นมถั่วเหลืองและนมยาคั่ว จากนั้นเตรียมนมทั้ง 2 ชนิด ใส่ในโหลแก้วเพื่อทำการหมัก โหลละ 200 มิลลิลิตร ชนิดละ 3 โหล แล้วนำหัวเชื้อคิเฟอร์ 5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เติมน้ำไปในแต่ละโหล ผสมให้เข้ากัน ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง หลังการบ่มทำการกรองแยกเมล็ดคิเฟอร์ (kefir grain) ออก และนำนมที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 x g เป็นเวลา 10 นาที แยกตะกอนทิ้งนำของเหลวที่ได้คิเฟอร์เวย์ไปเข้าเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dry) เพื่อทำให้แห้ง และเก็บคิเฟอร์เวย์แห้งไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไทโรซิเนสและฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อสิวต่อไป

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอ้างอิงจากวิธีของ Srisayam & Chantawannakul (2010) นำตัวอย่างคิเฟอร์เวย์มาทำเป็นสารละลายโดยใช้ น้ำกลั่นปลอดเชื้อ เจือจางตัวอย่างคิเฟอร์เวย์ให้ได้ความเข้มข้นที่ 0.5-15 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เตรียมสารละลาย DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl) โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายให้อยู่ในรูปของอนุมูลอิสระ DPPH ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.01 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ทำการทดสอบโดยการดูดตัวอย่างคิเฟอร์เวย์ แต่ละความเข้มข้นปริมาตร 0.75 มิลลิลิตร ใส่ลงในสารละลาย DPPH ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex ทิ้งไว้ 15 นาที ในที่มืด นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยมี ascorbic acid เป็น positive control นำค่าที่ได้มาคำนวณหา % inhibition ซึ่ง % inhibition สามารถคำนวณได้ตามสมการ (1) (Srisayam & Chantawannakul, 2010) และรายงานเป็นค่า IC₅₀ คือ ความเข้มข้นของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% ได้จากการสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % inhibition กับความเข้มข้นของตัวอย่างคิเฟอร์เวย์ที่ใช้

$$\% \text{ inhibition} = \frac{[\text{Absorbance } 517 \text{ Control} - \text{Absorbance } 517 \text{ Sample}]}{\text{Absorbance } 517 \text{ Control}} \times 100 \quad (1)$$

การทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อให้เกิดสิวด้วยวิธี Agar well diffusion

แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบได้แก่ *P. acnes* DMST 14916 และ *S. aureus* DMST 8013 ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *S. aureus* DMST 8013 ในอาหารเหลว nutrient broth (NB) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วน *P. acnes* DMST 14916 เลี้ยงในอาหาร brain heart infusion (BHI) broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน โดยเพาะเลี้ยงใน anaerobic jar เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นปรับความขุ่นของเชื้อทดสอบให้ได้เท่ากับความขุ่นมาตรฐาน

บทความวิจัย

McFarland No.0.5 (1.5×10^8 CFU/ml) สำหรับเชื้อ *S. aureus* DMST 8013 และ McFarland No.2 (6×10^8 CFU/ml) สำหรับเชื้อ *P. acnes* DMST 14916 ทำการ spread plate ในอาหาร nutrient agar (NA) สำหรับเชื้อ *S. aureus* DMST 8013 และ spread plate ในอาหาร brain heart infusion agar สำหรับเชื้อ *P. acnes* DMST 14916 เจาะหลุมโดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร จากนั้นละลายตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้มีระดับความเข้มข้นเท่ากับ 50 100 และ 250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลุม ใช้ยาปฏิชีวนะ ampicillin ที่ระดับความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เป็น positive control และน้ำกลั่นฆ่าเชื้อเป็น negative control นำเชื้อ *S. aureus* DMST 8013 ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ เชื้อ *P. acnes* DMST 14916 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนใน anaerobic jar เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บันทึกผลการทดสอบโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง มีหน่วยเป็นมิลลิเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ (Srisayam & Chantawannakul, 2010)

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไทโรซิเนส

วิเคราะห์ฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไทโรซิเนสดัดแปลงมาจาก Momtaz *et al.* (2008) ใช้ตัวอย่างคีเฟอร์เวย์ที่ละลายในน้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร 60 ไมโครลิตร เติมนสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.1 โมลาร์, pH 6.8) ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ผสมกับเอนไซม์ mushroom tyrosinase (Sigma-Aldrich, USA) 25 ยูนิต/มิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใน 96 well plate จากนั้นเติมสารตั้งต้น (substrate) L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) ที่ละลายใน 0.1 โมลาร์ PBS pH 6.8 ปริมาตร 80 ไมโครลิตร โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายของตัวอย่างคีเฟอร์เวย์เท่ากับ 15 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 475 นาโนเมตร โดยใช้ kojic acid ความเข้มข้นสุดท้าย 30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็น positive control เมื่อได้ค่า OD นำไปหาค่า % inhibition ดังสมการ (2) (Momtaz *et al.*, 2008)

$$\% \text{ inhibition} = [(\text{Absorbance } 475 \text{ Control} - \text{Absorbance } 475 \text{ Sample}) / \text{Absorbance } 475 \text{ Control}] \times 100 \quad (2)$$

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลการทดลองแสดงข้อมูลในรูปของค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทำการทดลอง 3 ซ้ำ การวิเคราะห์ข้อมูลโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way ANOVA) และ Tukey's test ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ($P < 0.05$)

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล**การเตรียมตัวอย่างคีเฟอร์เวย์จากนมถั่วเหลืองและนมงาดำ**

จากการเตรียมนมถั่วเหลืองและนมงาดำ 200 มิลลิลิตร แล้วนำมามากกับหัวเชื้อคีเฟอร์ 5 % (w/v) ได้น้ำหนักที่ผ่านการทำแห้งของตัวอย่างคีเฟอร์เวย์แสดงดังตารางที่ 1

บทความวิจัย

ผลการทดลองนำนมถั่วเหลืองและนมผงดำที่ไม่ผ่านการหมัก ปริมาตร 100 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงและทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักหลังการทำแห้งพบว่านมถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการหมัก (2.49 ± 0.21 g/100 ml ตัวอย่าง) มีน้ำหนักที่ผ่านการทำแห้งมากกว่านมผงดำที่ไม่ผ่านการหมัก (0.20 ± 0.06 g/100 ml ตัวอย่าง) อาจเกิดจากนมถั่วเหลืองมีองค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรต (35%) และโปรตีน (40-41%) มากกว่าและมีปริมาณไขมัน (8.1-24%) ที่น้อยกว่านมผงดำ ขณะที่คาร์โบไฮเดรต โปรตีนและไขมันที่เป็นองค์ประกอบเท่ากับ 10-15% 15-20% และ 45-50% ตามลำดับ (Jeong *et al.*, 2004; Medic *et al.*, 2014) ดังนั้นเมื่อทำเป็นนมนมถั่วเหลืองส่วนใหญ่ของนมนมคือคาร์โบไฮเดรตและโปรตีน จึงทำให้น้ำหนักที่ผ่านการทำแห้งของนมผงดำน้อยกว่านมถั่วเหลือง

การทดสอบหมักหัวเชื้อคีเฟอร์กับนมถั่วเหลืองและนมผงดำปริมาตร 100 มิลลิลิตร เมื่อผ่านกระบวนการหมักเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าน้ำหนักที่ผ่านการทำแห้งของคีเฟอร์เวย์จากนมถั่วเหลืองลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับนมถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการหมัก (ตารางที่ 1) เป็นไปได้ว่าจุลินทรีย์มีการใช้สารอาหารจากแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนในนมถั่วเหลืองเพื่อการเจริญ นอกจากนี้แบคทีเรียกลุ่มแลคติกในคีเฟอร์เพิ่มจำนวนขึ้นและมีการสร้างกรดทำให้โปรตีนบางส่วนที่คงเหลือจากการใช้ของจุลินทรีย์ตกตะกอนจึงทำให้น้ำหนักที่ผ่านการทำแห้งหลังการหมักลดลง และเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักที่ผ่านการทำแห้งของคีเฟอร์เวย์จากนมถั่วเหลืองที่ผ่านการหมักในระยะเวลาต่าง ๆ พบว่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อย อาจเนื่องมาจากจุลินทรีย์ผลิตสารบางชนิดเพิ่มขึ้น หนึ่งในสารดังกล่าวคือสารกลุ่มเอ็กโซโพลิแซ็กคาไรด์ (exopolysaccharide) ซึ่งสารกลุ่มนี้มีลักษณะเป็นเมือกเหนียวหรือชั้นเหนียวเกิดได้จากผลิตภัณฑ์นมที่ได้หลังการหมัก จากการศึกษาของ Cerning *et al.* (1994) พบว่าเมื่อใช้กลูโคส 20 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน *Lactobacillus casei* CG11 สามารถผลิตเอ็กโซโพลิแซ็กคาไรด์ได้สูงถึง 160 มิลลิกรัม/ลิตร สอดคล้องกับงานวิจัยของ Grobber *et al.* (1997) พบว่า *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนทำให้สามารถผลิตเอ็กโซโพลิแซ็กคาไรด์ได้ 95 มิลลิกรัม/ลิตร ขณะที่น้ำหนักที่ผ่านการทำแห้งของคีเฟอร์เวย์จากนมผงดำเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับนมผงดำที่ไม่ผ่านการหมัก (ตารางที่ 1) อาจเกิดจากปริมาณสารอาหารจากแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนในนมผงดำมีปริมาณน้อยเพียงพอสำหรับจุลินทรีย์ใช้เป็นสารอาหารเพื่อการเจริญ ในกระบวนการเมตาบอลิซึมและสร้างสารใหม่ขึ้นมาระหว่างการหมักจึงทำให้น้ำหนักที่ผ่านการทำแห้งของคีเฟอร์เวย์จากนมผงดำเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามน้ำหนักที่ผ่านการทำแห้งของคีเฟอร์เวย์จากนมผงดำ ในระยะเวลาการหมักที่ 24 48 และ 72 ชั่วโมง ไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักที่ผ่านการทำแห้งของคีเฟอร์เวย์จากนมถั่วเหลืองและนมผงดำในระยะเวลาการหมักที่ 24 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าที่ระยะเวลาการหมัก 24 และ 48 ชั่วโมง น้ำหนักที่ผ่านการทำแห้งไม่แตกต่างกัน แต่ในระยะเวลาการหมักที่ 72 ชั่วโมง น้ำหนักที่ผ่านการทำแห้งของคีเฟอร์เวย์จากนมถั่วเหลืองสูงกว่าคีเฟอร์เวย์จากนมผงดำ อาจเป็นผลเนื่องจากน้ำหนักที่ผ่านการทำแห้งของคีเฟอร์เวย์ที่ได้จากนมถั่วเหลืองมีแนวโน้มสูงขึ้นตามระยะเวลาการหมักที่เพิ่มขึ้น ซึ่งอาจเกิดจากการที่จุลินทรีย์ในคีเฟอร์สามารถใช้และเปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนเป็นสารเมตาบอลิท์ชนิดใหม่ที่มีขนาดเล็กและไม่สามารถตกตะกอนได้จากการปั่นเหวี่ยงเพิ่มขึ้น จึงทำให้น้ำหนักที่ผ่านการทำแห้งของคีเฟอร์เวย์จากนมถั่วเหลืองมากกว่าน้ำหนักที่ผ่านการทำแห้งของคีเฟอร์เวย์จากนมผงดำในระยะเวลาการหมักที่ 72 ชั่วโมง

ตารางที่ 1 น้ำหนักของตัวอย่างที่ผ่านการทำแห้งของนมถั่วเหลืองและนมงาดำที่ไม่ผ่านการหมักด้วยหัวเชื้อคีเฟอร์และตัวอย่างคีเฟอร์เวย์จากนมถั่วเหลืองและนมงาดำหมักด้วยหัวเชื้อคีเฟอร์ในระยะเวลาหมัก 24 48 และ 72 ชั่วโมง

ชนิดนม	น้ำหนักของตัวอย่างที่ผ่านการทำแห้ง (g/100 ml ตัวอย่าง) (\pm SD)			
	ไม่ผ่านการหมัก	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
ถั่วเหลือง	2.49 \pm 0.21 ^a	0.66 \pm 0.12 ^a	0.74 \pm 0.16 ^a	0.82 \pm 0.09 ^a
งาดำ	0.20 \pm 0.06 ^b	0.50 \pm 0.07 ^a	0.62 \pm 0.11 ^a	0.55 \pm 0.05 ^b

ตัวอักษรยกกำลังที่ต่างกันในคอลัมน์ (a,b) แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

จากการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของคีเฟอร์เวย์จากนมถั่วเหลืองและนมงาดำ โดยทำการหมักนมทั้ง 2 ชนิดด้วยหัวเชื้อคีเฟอร์เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง โดยมีนมที่ไม่ผ่านการหมักด้วยหัวเชื้อคีเฟอร์เป็นตัวเปรียบเทียบ ผลที่ได้จากการหมักแสดงในตารางที่ 2 พบว่าคีเฟอร์เวย์จากนมงาดำมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้สูงกว่าคีเฟอร์เวย์จากนมถั่วเหลืองในทุกชั่วโมงการหมัก และยับยั้งอนุมูลอิสระได้สูงสุดในระยะเวลาการหมักที่ 72 ชั่วโมง มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.78 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ส่วนคีเฟอร์เวย์จากนมถั่วเหลืองมีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.00 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และนมงาดำในสภาวะที่ไม่ผ่านการหมักมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้สูงกว่านมถั่วเหลือง คาดว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของนมงาดำและนมถั่วเหลืองมาจากสารองค์ประกอบในธัญพืชที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระคือ เซซามิน (sesamin) เซซาโมลิน (sesamol) และ เซซามอล (sesamol) ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระประสิทธิภาพสูง ส่วนถั่วเหลืองมีสารไอโซฟลาโวน (isoflavone) ให้ผลในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Srisayam *et al.*, 2014; Mujić *et al.*, 2011) เมื่อทำการหมักนมในระยะเวลาที่แตกต่างกัน ผลของการหมักส่งผลให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ผ่านการหมัก และค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้นตามระยะเวลาในการหมักที่เพิ่มขึ้นทั้งคีเฟอร์เวย์จากนมถั่วเหลืองและนมงาดำ ซึ่งปัจจัยที่อาจทำให้เกิดผลดังกล่าวเนื่องจากจุลินทรีย์ในคีเฟอร์มีการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนในนมธัญพืชจากการทำงานของเอนไซม์ในกระบวนการไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ได้คีเฟอร์แรน (kefiran) และโปรตีนไฮโดรไลเซต (protein hydrolysate) ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (De Oliveira *et al.*, 2015; Korhonen, 2009) โดยมีรายงานว่าคีเฟอร์แรนและโปรตีนไฮโดรไลเซตมีผลต่อต้านอนุมูลอิสระได้หลายกลไก เช่น radical quenching capacity (1) chelation of metal ions (2) และ reducing power (3) (De Oliveira *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2015; Peng *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010)

ตารางที่ 2 ผลของการหมักต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของคีเฟอร์เวย์จากนมถั่วเหลืองและนมงาดำในเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง

ชนิดของคีเฟอร์เวย์	เวลาในการหมัก (ชั่วโมง)	IC ₅₀ (mg/ml)
นมถั่วเหลือง	-	7.04
	24	6.41
	48	4.23
	72	2.00
นมงาดำ	-	2.17
	24	1.58
	48	1.26
	72	0.78
Ascorbic acid (µg/ml)	-	3.05

- หมายถึง ไม่ผ่านการหมัก

การทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อให้เกิดสิว

ในการศึกษาฤทธิ์ของคีเฟอร์เวย์จากนมถั่วเหลืองและนมงาดำในการยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเกิดสิว 2 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcus aureus* DMST 8013 และ *Propionibacterium acnes* DMST 14916 ผลที่ได้พบว่าคีเฟอร์เวย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียแตกต่างกัน โดยพบว่าคีเฟอร์เวย์จากนมถั่วเหลืองสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ทั้ง 2 ชนิด ในขณะที่คีเฟอร์เวย์จากนมงาดำยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้เพียงชนิดเดียวคือ *P. acnes* DMST 14916 นอกจากนี้ยังพบว่าคีเฟอร์เวย์ที่ได้จากการหมักที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแตกต่างกัน และประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียของคีเฟอร์เวย์แปรผันตามความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ โดยคีเฟอร์เวย์จากนมถั่วเหลืองที่ได้จากการหมักนาน 48 ชั่วโมง ที่ระดับความเข้มข้นสูงสุด 250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้ง *P. acnes* DMST 14916 ได้เพียงชนิดเดียว ในขณะที่คีเฟอร์เวย์จากนมถั่วเหลืองที่ได้จากการหมักนาน 72 ชั่วโมง ที่ระดับความเข้มข้น 250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งได้ทั้ง *S. aureus* DMST 8013 และ *P. acnes* DMST 14916 โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเท่ากับ 12 ± 0.00 มิลลิเมตร และ 11.50 ± 0.00 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 3 และ ตารางที่ 4) สำหรับคีเฟอร์เวย์นมงาดำที่ได้จากการหมักนาน 24 ชั่วโมง ที่ระดับความเข้มข้นสูงสุด 250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบทั้งสองชนิดได้ ในขณะที่คีเฟอร์เวย์นมงาดำที่ได้จากการหมักนาน 48 และ 72 ชั่วโมง ที่ระดับความเข้มข้นสูงสุด 250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. acnes* DMST 14916 ได้เพียงชนิดเดียว โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเท่ากับ 11.00 ± 0.00 และ 14.67 ± 0.58 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าส่วนของเวย์ที่ได้จากนมถั่วเหลืองและนมงาดำที่ไม่ได้ผ่านการหมักที่ระดับความเข้มข้นสูงสุด 250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ไม่สามารถแสดงฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียทดสอบทั้ง 2 ชนิด ได้ แม้จะมีการรายงานว่

ถั่วเหลืองและงาคั่วมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียโดยทำการทดสอบจากสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (Nigam *et al.*, 2015; Laodheerasiri & Pathirage, 2017) แต่จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จากงาและถั่วเหลืองมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียได้ (Das *et al.*, 2012; Joo *et al.*, 2004) ในถั่วเหลืองมีรายงานงาโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จาก glycinin และ β -conglycinin (soy protein isolates, SPIs) มีฤทธิ์ยับยั้ง *Escherichia coli* ATCC 26922 ได้ไม่แตกต่างกัน ขณะที่โปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จาก glycinin ยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 *Salmonella enterica* ATCC 13312 *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 *Streptococcus mutans* ATCC 25175 และ *Propionibacterium acnes* ATCC 6919 ได้ดีกว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จาก β -conglycinin (Vasconcellos *et al.*, 2014) ดังนั้นในการยับยั้งแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดของคีเฟอร์เวย์จากนมถั่วเหลืองและนมงาคั่วจะเกิดจากโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จากโปรตีนในถั่วเหลืองและจุลินทรีย์ในคีเฟอร์ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพขึ้นมาเพื่อยับยั้งแบคทีเรีย เช่น คีเฟอร์เรน แบคทีเรียโอซิน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และกรดอินทรีย์ แต่ปริมาณมากน้อยขึ้นอยู่กับชนิดของนมที่ใช้ในการหมัก

จากการวัดค่า pH ของคีเฟอร์เวย์จากนมถั่วเหลืองและนมงาคั่วที่ผ่านกระบวนการหมักนาน 72 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับเวย์ที่ได้จากนมถั่วเหลืองและนมงาคั่วที่ไม่ผ่านการหมัก พบว่าคีเฟอร์เวย์จากนมถั่วเหลืองและนมงาคั่วที่ไม่ผ่านการหมักมีค่า pH เท่ากับ 6.37 และ 6.17 ตามลำดับ ในขณะที่คีเฟอร์เวย์ที่ได้จากการหมักนมถั่วเหลืองและนมงาคั่วมีค่า pH เท่ากับ 4.6 และ 4.75 ตามลำดับ ค่า pH ที่ลดลงแสดงถึงปริมาณกรดอินทรีย์ที่เพิ่มขึ้นเมื่อผ่านกระบวนการหมัก ดังนั้นการเพิ่มขึ้นของกรดในตัวอย่างคีเฟอร์เวย์จึงเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้คีเฟอร์เวย์จากนมถั่วเหลืองและนมงาคั่วแสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบได้ อย่างไรก็ตามเพื่อเป็นการยืนยันผลของกรดอินทรีย์ที่มีต่อการยับยั้งแบคทีเรียควรมีการปรับ pH ของคีเฟอร์เวย์ก่อนการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียเทียบกับตัวอย่างคีเฟอร์เวย์ที่ไม่ได้ปรับ pH การที่คีเฟอร์เวย์จากนมถั่วเหลืองและนมงาคั่วมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียที่แตกต่างกันนั้น อาจเป็นผลมาจากความแตกต่างของชนิดโปรตีนไฮโดรไลเซต คีเฟอร์เรนและแบคทีเรียโอซินในตัวอย่างคีเฟอร์เวย์ ดังนั้นควรทำการทดสอบเพิ่มเติมเพื่อยืนยันฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของคีเฟอร์เวย์ว่าเกิดจากโปรตีนไฮโดรไลเซต คีเฟอร์เรนและแบคทีเรียโอซิน รวมทั้งระบุชนิดคีเฟอร์เรนและแบคทีเรียโอซินที่ได้จากคีเฟอร์เวย์นมถั่วเหลืองและนมงาคั่วในการศึกษาต่อไป

มีรายงานว่าคีเฟอร์มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย รา และยีสต์ก่อโรคได้ (Lopitz *et al.*, 2006; Ismaiel *et al.*, 2011; Bolla *et al.*, 2013) โดยจุลินทรีย์ในคีเฟอร์จะผลิต คีเฟอร์เรน แบคทีเรียโอซิน กรดแลคติก กรดอะซิติก และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เพื่อยับยั้งเชื้อก่อโรค (Mishra & Lambert, 1996) คีเฟอร์เรน สารประเภทเอ็กโซโพลีแซ็กคาไรด์สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้หลายชนิด (Rodrigues *et al.*, 2005; Jenab *et al.*, 2017) แบคทีเรียโอซินเป็นที่รู้จักกันดีในอุตสาหกรรมอาหาร ซึ่งนำมาใช้ในการถนอมอาหารโดยสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียและจุลินทรีย์ก่อโรคได้ และยอมรับว่าเป็นสารที่มีความปลอดภัย (generally recognized as safe, GRAS) ตัวอย่างแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจาก *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* มีชื่อว่า นิสิน (nisin) ถูกนำมาใช้ในหลายประเทศ (Cleveland *et al.*, 2001; da Silva Malheiros *et al.*, 2010) โดยแบคทีเรียโอซินเป็นโปรตีนหรือเปปไทด์ที่ถูกผลิตมาจากแบคทีเรียกลุ่มแลคติกมีกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งและฆ่าแบคทีเรียอื่นโดยทำให้เกิดรูบนเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย (Ennahar *et al.*, 1999) Garrote *et al.* (2000) พบกรดอินทรีย์ ได้แก่ กรดแลคติกและกรดอะซิติกที่ได้จากการหมักนมด้วยคีเฟอร์มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย และจากการทดสอบพบว่ากรดอินทรีย์สามารถ

บทความวิจัย

ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ Yüsekdağ *et al.* (2004) นอกจากนี้มีรายงานว่าแบคทีเรียกรดแลคติกในคีเฟอร์กลุ่ม lactococci จำนวน 11 สายพันธุ์ จาก 21 สายพันธุ์ สามารถผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ โดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีฤทธิ์ในการฆ่าแบคทีเรีย ผ่านกระบวนการออกซิเดชันของไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์สูญเสียความสามารถในการเป็นเยื่อเลือกผ่านสำหรับการเข้าออกของสารที่เยื่อหุ้มเซลล์ และทำให้เกิดความเสียหายของกรดนิวคลีอิกและโปรตีนด้วย (Piard & Desmazeaud, 1991; Naidu *et al.*, 1999)

ตารางที่ 3 ผลการยับยั้ง *S. aureus* DMST 8013 ของคีเฟอร์จากนมถั่วเหลืองและนมงาดำ

ชนิดของคีเฟอร์	ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (mean \pm SD) (mm)		
	ความเข้มข้น 50 mg/ml	ความเข้มข้น 100 mg/ml	ความเข้มข้น 250 mg/ml
นมถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการหมัก	ND	ND	NA
นมถั่วเหลืองหมัก 24 ชั่วโมง	NA	NA	NA
นมถั่วเหลืองหมัก 48 ชั่วโมง	NA	NA	NA
นมถั่วเหลืองหมัก 72 ชั่วโมง	9 \pm 0.00	10.33 \pm 0.58	12.00 \pm 0.00
นมงาดำที่ไม่ผ่านการหมัก	ND	ND	NA
นมงาดำหมัก 24 ชั่วโมง	NA	NA	NA
นมงาดำหมัก 48 ชั่วโมง	NA	NA	NA
นมงาดำหมัก 72 ชั่วโมง	NA	NA	NA
Ampicillin (100 μ g/ml)	34.67 \pm 0.58	34.67 \pm 0.58	34.67 \pm 0.58
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	NA	NA	NA

NA หมายถึง ไม่พบบริเวณยับยั้งรอบแผ่นดิสก์ทดสอบที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร; ND หมายถึง ไม่ได้ทดสอบ

ตารางที่ 4 ผลการยับยั้ง *P. acnes* DMST 14916 ของคีเฟอร์เวย์จากนมถั่วเหลืองและนมงาดำ

ชนิดของคีเฟอร์เวย์	ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (mean ± SD) (mm)		
	ความเข้มข้น 50 mg/ml	ความเข้มข้น 100 mg/ml	ความเข้มข้น 250 mg/ml
นมถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการหมัก	ND	ND	NA
นมถั่วเหลืองหมัก 24 ชั่วโมง	NA	NA	NA
นมถั่วเหลืองหมัก 48 ชั่วโมง	7.00±0.00 ^a	8.00±0.00 ^b	10.00±0.00 ^a
นมถั่วเหลืองหมัก 72 ชั่วโมง	8.00±0.00 ^b	9.00±0.00 ^c	11.50±0.00 ^f
นมงาดำที่ไม่ผ่านการหมัก	ND	ND	NA
นมงาดำหมัก 24 ชั่วโมง	NA	NA	NA
นมงาดำหมัก 48 ชั่วโมง	NA	7.00±0.00 ^a	11.00±0.00 ^b
นมงาดำหมัก 72 ชั่วโมง	8.67±0.58 ^b	11.67±0.58 ^d	14.67±0.58 ^c
Ampicillin (100 µg/ml)	30.67±0.58 ^d	30.67±0.58 ^d	30.67±0.58 ^d
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	NA	NA	NA

ตัวอักษรยกกำลังที่ต่างกันในแต่ละคอลัมน์ (a-e) แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$); NA หมายถึง ไม่พบบริเวณยับยั้งรอบแผ่นดิสก์ทดสอบที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร; ND หมายถึง ไม่ได้ทดสอบ

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไทโรซิเนส (mushroom tyrosinase inhibition assay)

การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไทโรซิเนสของคีเฟอร์เวย์จากนมถั่วเหลืองและนมงาดำที่ระดับความเข้มข้น 15 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร พบว่าความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์เพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาการหมักที่เพิ่มขึ้น และพบว่า คีเฟอร์เวย์จากนมถั่วเหลืองและนมงาดำที่ได้จากการหมักนาน 72 ชั่วโมง แสดงฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ได้ไม่แตกต่างกัน ($p = 0.248$) โดยมี % inhibition เท่ากับ $48.41 \pm 0.33\%$ และ $48.99 \pm 0.19\%$ ตามลำดับ (ตารางที่ 5) การศึกษาในคีเฟอร์นม และพบว่า ความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไทโรซิเนสของคีเฟอร์เวย์เกิดจากองค์ประกอบของเปปไทด์ และกรดแลคติกซึ่งเป็นสารที่แบคทีเรียกลุ่มแลคติกในคีเฟอร์ผลิตขึ้นในระหว่างการหมักนม มีการทดสอบใช้คีเฟอร์เวย์ กรดแลคติก และเปปไทด์ ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่าสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้โดยผ่านกลไกการจับกับคอปเปอร์ (Cu) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ไทโรซิเนส ทำให้เอนไซม์เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไป จึงสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ (Chen *et al.*, 2006; Usuki *et al.*, 2003)

ตารางที่ 5 การยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไทโรซิเนส (%inhibition) ของคีเฟอร์เวย์จากนมถั่วเหลืองและนมงาดำที่ระดับความเข้มข้น 15 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ชนิดของคีเฟอร์เวย์	การยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไทโรซิเนส (%inhibition ± SD)
นมถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการหมัก	13.32±0.07 ^a
นมถั่วเหลืองหมัก 24 ชั่วโมง	21.34±0.26 ^c
นมถั่วเหลืองหมัก 48 ชั่วโมง	41.45±0.28 ^f
นมถั่วเหลืองหมัก 72 ชั่วโมง	48.41±0.33 ^g
นมงาดำที่ไม่ผ่านการหมัก	19.12±0.29 ^b
นมงาดำหมัก 24 ชั่วโมง	27.03±0.21 ^d
นมงาดำหมัก 48 ชั่วโมง	40.56±0.32 ^e
นมงาดำที่หมัก 72 ชั่วโมง	48.99±0.19 ^g
Kojic acid (30 µg/ml)	66.55±0.2 ^h

ตัวอักษรยกกำลังที่ต่างกันในคอลัมน์ (a-h) แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาผลการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของคีเฟอร์เวย์จากนมธัญพืช ได้แก่ คีเฟอร์เวย์จากนมถั่วเหลืองและคีเฟอร์เวย์จากนมงาดำในการต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเกิดสิว และฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไทโรซิเนส จากการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระพบว่าคีเฟอร์เวย์จากนมงาดำเป็นตัวแทนที่ดีในการต้านอนุมูลอิสระ การยับยั้งเชื้อที่เป็นสาเหตุของการเกิดสิวพบว่าคีเฟอร์เวย์จากนมถั่วเหลืองยับยั้ง *S. aureus* DMST 8013 ได้ดีกว่าคีเฟอร์เวย์จากนมงาดำ ขณะที่คีเฟอร์เวย์จากนมงาดำไม่สามารถยับยั้ง *S. aureus* DMST 8013 ได้ คีเฟอร์เวย์งาดำสามารถยับยั้ง *P. acnes* DMST 14916 ได้ดีกว่าคีเฟอร์เวย์จากนมถั่วเหลือง และผลการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสพบว่าคีเฟอร์เวย์ทั้ง 2 ชนิดแสดงฤทธิ์การยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ได้ใกล้เคียงกันที่ระยะเวลาในการหมัก 72 ชั่วโมง จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าระยะเวลาในการหมักที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีในการทดลองนี้คือ 72 ชั่วโมง สรุปได้ว่าคีเฟอร์เวย์จากนมถั่วเหลืองมีฤทธิ์ครอบคลุมทุกการทดสอบที่ใช้ในการศึกษานี้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากทุนพัฒนาองค์ความรู้ สถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 สัญญาเลขที่ RDI-2-60-6-27 และขอขอบคุณ ศูนย์วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม สำหรับสถานที่และเครื่องมือที่ใช้ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- Bolla, P.A., Carasi, P., Bolla, Mde, L., DeAntoni, G.L., & Serradell Mde, L. (2013). Protective effect of a mixture of kefir-isolated lactic acid bacteria and yeasts in a hamster model of *Clostridium difficile* infection. *Anaerobe*, 21, 28-33.
- Cerning, J., Renard, C.M.G.C., Thibault, J.F., Boullanne, C., Landon, M., Desmazeaud, M., & Topisirovic, L. (1994). Carbon source requirements for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11 and partial structure analysis of the polymer. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 3914-3919.
- Chen, M.J., Liu, J.R., Sheu, J.F., Lin, C.W., & Chuang, C.L. (2006). Study on skin care properties of milk. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, 19(6), 905-908.
- Chen, Z., Shi, J., Yang, X., Nan, B., Liu, Y., & Wang, Z. (2015). Chemical and physical characteristics and antioxidant activities of the exopolysaccharide produced by Tibetan kefir grains during milk fermentation. *International Dairy Journal*, 43, 15-21.
- Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F., & Chikindas, M.L. (2001) Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 71, 1-20.
- Da Silva Malheiros, P., Daroit, D.J., & Brandelli, A. (2010). Food applications of liposome-encapsulated antimicrobial peptides. *Trends in Food Science & Technology*, 21, 284-292.
- Das, R., Dutta, A., & Bhattacharjee, C. (2012). Preparation of sesame peptide and evaluation of antibacterial activity on typical pathogens. *Food Chemistry*, 131(4), 1504-1509.
- De Oliveira, C.F., Corrêa, A.P., Coletto, D., Daroit, D.J., Cladera-Olivera, F., & Brandelli, A. (2015). Soy protein hydrolysis with microbial protease to improve antioxidant and functional properties. *Journal of Food Science & Technology*, 52, 2668-2678.
- Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K., & Ishizaki, A. (2000). Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiology Reviews*, 24, 85-106.
- Farnworth, E.R. (1999). Kefir: from folklore to regulatory approval. *Journal of Nutraceuticals, Functional & Medical Foods*, 1, 57-68.
- Farnworth, E. R. (2005). Kefir A complex probiotic. *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods*, 2(1), 1-17.
- Garrote, G.L., Abraham, A.G., & De Antoni, G.L. (2000). Inhibitory power of kefir: the role of organic acids. *Journal of Food Protection*, 63, 364-369.
- Grobben, G.J., van Casteren, W.H.M., Schols, H.A., Oosterveld, A., Sala, G., Smith, M.R., Sikkema, J., & de Bont, J.A.M. (1997) Analysis of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 grown in continuous culture on glucose and fructose. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 48, 516-521.

- Ismail, A.A., Ghaly, M.F., & El-Naggar, A.K. (2011). Milk kefir: ultrastructure, antimicrobial activity and efficacy on aflatoxin b1 production by *Aspergillus flavus*. *Current Microbiology*, 62, 1602-1609.
- Jenab, A., Roghanian, R., Emtiazi, G., & Ghaedi, K. (2017). Manufacturing and structural analysis of antimicrobial kefiran/ polyethylene oxide nanofibers for food packaging. *Iranian Polymer Journal*, 26, 31-39.
- Jeong, S.M., Kim, S.Y., Kim, D.R., Nam, K.C., Ahn, D.U. & Lee, S.C. (2004). Effect of seed roasting conditions on the antioxidant activity of defatted sesame meal extracts. *Journal of Food Science*, 69(5), 377-381.
- Joo, J.H., Yi, S.D., Lee, G.H., Lee, Kyung-Tae & Oh, M.J. (2004). Antimicrobial activity of soy protein hydrolysate with *Asp. saitoi* pretense. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 33, 229-235.
- Korhonen, H. (2009). Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *Journal of Functional Foods*, 1, 177-187.
- Laodheerasiri, S., & Pathirage, N.H. (2017). Antimicrobial activity of raw soybean, soybean flour and roasted soybean extracted by ethanol-hexane method. *British Food Journal*, 119 (10), 2277-2286.
- Lopitz, F.O., Rementeria, A., Elguezabal, N., & Garaizar, J. (2006). Kefir: a symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. *Revista Iberoamericana de Micología*, 23(2), 67-74.
- Mascarher, T.N., Margulis, G. Wang, T, Ye, R.W., & Helmann, J.D. (2003). Cell wall stress response in *Bacillus subtilis*: the regulatory network of the bacitracin stimulon. *Molecular Microbiology*, 50, 1591-1604.
- Medic, J., Atkinson, C., & Hurburgh, Jr., C.R. (2014). Current knowledge in soybean composition. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 91, 363-384.
- Mishra, C., & Lambert, J. (1996). Production of anti-microbial substances by probiotics. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 5, 20-24.
- Mujić, I., Šertović, E., Jokić, S., Sarić, Z., Alibabić, V., Vidović, S., & Živković, J. (2011). Isoflavone content and antioxidant properties of soybean seeds. *Croatian Journal of Food Science and Technology*, 3 (1), 16-20.
- Momtaz, S., Mapunya, B.M., Houghton, P.J., Edgerly, C., Hussein, A., Naidoo, S., & Lall, N. (2008). Tyrosinase inhibition by extracts and constituents of *Sideroxylon inerme* L. stem bark, used in South Africa for skin lightening. *Journal of Ethnopharmacology*, 119(3), 507-512.
- Naidu, A.S., Bidlack, W.R., & Clemens, R.A. (1999). Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38, 13-126.
- Nigam, D., Singh, C., & Tiwari, U. (2015). Evaluation of in vitro study of antioxidant and antibacterial activities of methanolic seed extract of *Sesamum indicum*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 3(5), 88-92.

- Peng, X., Kong, B., Xia, X., & Liu, Q. (2010). Reducing and radical-scavenging activities of whey protein hydrolysates prepared with Alcalase. *International Dairy Journal*, 20, 360-365.
- Piard, J.C., & Desmazeaud, M. (1991). Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria: 1. Oxygen metabolites and catabolism en-products. *Lait*, 71, 525-541.
- Rekha, C., & Vijayalakshmi, G. (2008). Biomolecules and nutritional Quality of soymilk fermented with probiotic yeast and bacteria. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 151, 452-463.
- Rodrigues, K.L., Caputo, L.R.G., Carvalho, J.C.T., Evangelista, J., & Schneedorf, J.M. (2005). Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 25, 404-408.
- Srisayam, M., & Chantawannakul, P. (2010). Antimicrobial and antioxidant properties of Thai honeys produced by *Apis mellifera* in Thailand. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, 2 (2), 77-83.
- Srisayam, M., Weerapreeyakul, N., & Sribuarin, P. (2014). *In vitro* antioxidant activities of white, black and red sesame seeds. *Isan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10(2), 136-146.
- Usuki, A., Ohashi, A., Sato, H., Ochiai, Y., Ichihashi, M. & Funasaka, Y. (2003). The inhibitory effect of glycolic acid and lactic acid on melanin synthesis in melanoma cells. *Experimental Dermatology*, 2, 43-50.
- Vasconcellos, F.C.S., Woiciechowski, A.L., Soccol, V.T., Mantovani, D., & Soccol, C.R. (2014). Antimicrobial and antioxidant properties of β -conglycinin and glycinin from soy protein isolate. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(8), 144-157.
- Wang, Y., Yu, R., & Chou, C. (2006). Antioxidative activities of soymilk fermented with lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiology*, 23, 128-135.
- Yu'ksekgag, Z.N., Beyatli, Y., & Aslim, B. (2004). Determination of some characteristics coccoid forms of lactic acid bacteria isolated from Turkish kefir with natural probiotic. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 37, 663-667.
- Zhang, L., Li, J., & Zhou, K. (2010). Chelating and radical scavenging activities of soy protein hydrolysates prepared from microbial proteases and their effect on meat lipid peroxidation. *Bioresource Technology*, 101, 2084-2089.

ประวัติผู้วิจัย

1. หัวหน้าโครงการวิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) ดร. มนตรา ศรีษะแย้ม

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Dr. Montra Srisayam

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 1669900008386

3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์

4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก

สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

ต. พลายชุมพล อ. เมือง จ. พิษณุโลก 65000 โทรศัพท์ 055-267107, 0818722816

E-mail: srisayam_ssy@psru.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

วุฒิการศึกษา	สถาบัน	สาขาวิชา	ปีที่จบการศึกษา
ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต	มหาวิทยาลัยขอนแก่น	ชีวเวชศาสตร์	2557
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	เทคโนโลยีชีวภาพ	2553
วิทยาศาสตรบัณฑิต	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	จุลชีววิทยา	2550

6. สาขาวิชาที่มีความชำนาญพิเศษ

ชีวเวชศาสตร์ เทคโนโลยีชีวภาพ จุลชีววิทยา

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ: โดยระบุสถานภาพในการทำวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย เป็นต้น

ปี (ระยะเวลา)	ตำแหน่ง	เรื่อง (แหล่งทุน)
2560	หัวหน้าโครงการ	กิจกรรมด้านอนุมูลอิสระ ด้านเอนไซม์ไทโรซิเนส และด้านแบคทีเรียของคีเฟอร์นมธัญพืช (ทุนพัฒนาองค์ความรู้สถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม)
2559	ผู้ร่วมวิจัย	ผลของโคโคซานและกรดซาลิซิลิกต่อการลดอาการสะท้อนหนาวและรักษาคุณภาพของผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้สีทอง

		ระหว่างการรักษาที่อุณหภูมิต่ำ (ทุนสร้างสถานภาพนักวิจัยรุ่นใหม่ปี 2559)
2558	หัวหน้าโครงการ	การศึกษาเปรียบเทียบผลสัมฤทธิ์ทางการเรียนเรื่องสมุนไพรในชีวิตประจำวันของนักศึกษารายวิชาวิถีสุภาพระหว่างการสอนแบบบรรยายกับการสอนบรรยายร่วมกับการอบรม (ทุนพัฒนาการเรียนการสอน สถาบันวิจัยมหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม)
2557	ผู้ร่วมวิจัย	คุณสมบัติทางเคมีและทางชีวภาพของสารสกัดดอกดาวเรืองที่ผ่านการสกัดโดยไม่ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ (สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ)

8. ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่

งานวิจัยระดับนานาชาติ

Srisayam, M., Weerapreeyakul, N., Kanokmedhakul, K. Inhibition of two stages of melanin synthesis by sesamol, sesamin and sesamolin. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2017; 7(10): 886-895.

Srisayam, M., Weerapreeyakul, N., Barusrux, S. and Kanokmedhakul K. Anti-Oxidant, Anti-Melanogenic and Skin Protective Effect of Sesamol. *Journal of Cosmetic Science* 2014; 65: 1-11.

Srisayam, M., Weerapreeyakul, N., Barusrux, S., Tanthanuch W. and Thumanu, K. Application of FTIR microspectroscopy for characterization of biomolecular changes in human melanoma cells treated by sesamol and kojic acid. *Journal of Dermatological Science* 2014; 73: 241-250.

Srisayam, M. and Chantawannakul, P. Antimicrobial and antioxidant properties of Thai honeys produced by *Apis mellifera* in Thailand. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science* 2010; 2 (2): 77 – 83.

งานวิจัยระดับชาติ

Srisayam, M., Jooduang, J., Srisopa, A., Keerin, P. and Sangthong, S. (2018). Chemical

Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils from Three Curcuma Species in Thailand. *Rajabhat J. Sci. Humanit. Soc. Sci.* 19(2): 222-233.

Srisayam, M., Klinrat, J. and Chodnakarin, A. (2018). Biological Properties of Kefir Whey Samples Produced from Soy and Black Sesame Milks. *Burapha Science Journal*, 23(2), 872-886.

ศิริพร ศิริอังคณากุล, มนตรา ศรีษะแย้ม และเอกภพ จันทร์สุคนธ์. (2560). ผลของการทดแทนแป้งสาธิตด้วยกากสับปะรดต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของบิสกิตในระหว่างการเก็บรักษา. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*, 22 (3), 95-105.

อรอนงค์ โสิตา, มนตรา ศรีษะแย้ม, อรรถพล รอดแก้ว, จิตศิริณ ลายลักษณ์ และ ศติภาวรรณ มาชนะนา. (2560). การสำรวจสเต็มยารอยตีนยาชุดและยาสมุนไพรใน ตำบลบ้านโสก อำเภอหล่มสัก จังหวัดเพชรบูรณ์. *วารสารเภสัชกรรมไทย*, 9, 216-224.

Srisayam, M., Weerapreeyakul, N. and Sribuarin, P. (2014). *In vitro* antioxidant activities of white, black and red sesame seeds. *Isan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10(2): 136-146.