ฤทธิ์ทางชีวภาพของคีเฟอร์เวย์จากนมถั่วเหลืองและนมงาดำ

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

มนตรา ศรีษะแย้ม[1*], เจนจิรา กลิ่นรัตน์[1] และ อรุณลักษณ์ โชตินาคริน์[2]

Montra Srisayam[1*], Janejira Klinrat[1] and Arunluk Chodnakarin[2]

[1] *สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม*

[2] *สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม*

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

[2] *Biotechnology 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 IC_{50} เท่ากับ 0.78 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ผลการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่าคีเฟอร์เวย์จากนมธัญพืชทั้ง 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 ได้ นอกจากนี้พบว่าคีเฟอร์เวย์ทั้งสองชนิดมีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงขึ้นเมื่อระยะเวลาในการหมักเพิ่มขึ้น จากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าคีเฟอร์เวย์จากนมถั่วเหลืองและคีเฟอร์เวย์จากนมงาดำสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เวชสำอางได้

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±0.33% and 48.99±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 แบคทีเรียกรดอะซีติก (acetic acid bacteria) และยีสต์ (yeast) ทำให้ผลิตภัณฑ์นมหมักที่ได้มีองค์ประกอบของกรดแลคติก กรดอะซิติก แอลกอฮอร์เล็กน้อยและมีกลิ่นรสเฉพาะตัว จากรายงานพบว่าคีเฟอร์มีองค์ประกอบที่มีความสำคัญทางชีวภาพ ช่วยส่งเสริมสุขภาพและถือเป็นผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก (Farnworth *et al*., 1999; Mascarher *et al*., 2003)

คีเฟอร์เป็นผลิตภัณฑ์นมหมักที่ส่วนใหญ่อยู่ในรูปของเครื่องดื่มนมหมัก ผลิตจากหัวเชื้อคีเฟอร์หรือกล้าเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ในรูปของเม็ดคีเฟอร์ (kefir grain) มีรายงานว่าคีเฟอร์สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ เนื่องจากความเป็นกรด และมีการผลิตแบคเทอริโอซิน (bacteriocin) จากกลุ่ม lactic acid bacteria ซึ่งมีความปลอดภัยและเป็นประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมอาหารเพื่อใช้ในการถนอมอาหาร และใช้แทนสารปฏิชีวนะในผลิตภัณฑ์อาหารบางประเภทได้ (Cleveland *et al*., 2001; da Silva Malheiros *et al*., 2010) นอกจากนี้ยังมีผลดีต่อสุขภาพมากมาย โดยมีความสามารถเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ต้านมะเร็ง ช่วยให้ผิวขาวกระจ่างใสขึ้น และช่วยลดระดับคลอเรสเตอรอล (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) แต่ยังขาดการศึกษาในธัญพืชอื่น ๆ อีกมากที่สามารถผลิตเป็นน้ำนมพืชได้ ซึ่งงาดำถือได้ว่าเป็นธัญพืชที่มีความน่าสนใจมาก เนื่องจากเป็นแหล่งแคลเซียมสูงจึงมีการนำงาดำมาเป็นองค์ประกอบของอาหารและเครื่องดื่มนมธัญพืช เป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งแบคทีเรียบางชนิดได้ เป็นเหตุให้มีการนำงาดำมาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางในการดูแลผิวพรรณ (Srisayam *et al*., 2014; Nigam *et al*., 2015)

ดังนั้นจากข้อมูลที่กล่าวมาน่าจะเป็นไปได้ว่าการหมักนมที่ผลิตจากธัญพืชด้วยหัวเชื้อคีเฟอร์ช่วยเพิ่มฤทธิ์ทางชีวภาพให้สูงขึ้นได้ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไทโรซิเนสและฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้เกิดสิวจากคีเฟอร์เวย์จากนมถั่วเหลืองและนมงาดำ 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 l (Danisco, Poland))

การเพาะเลี้ยงหัวเชื้อคีเฟอร์

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

หัวเชื้อโดยใช้เม็ดคีเฟอร์ 10 กรัม ต่อนมพาสเจอร์ไรส์ปริมาตร 200 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการกรองและเก็บเม็ดคีเฟอร์ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อต่อไป

การเตรียมตัวอย่างคีเฟอร์เวย์ (kefir whey) จากนมถั่วเหลืองและนมงาดำ

การทำนมธัญพืช เริ่มจากนำเมล็ดถั่วเหลืองและงาดำ อย่างละ 250 กรัม แช่น้ำไว้เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นให้เมล็ดแตกโดยการเติมน้ำลงไป 1,000 มิลลิลิตร (250 กรัม : 1,000 มิลลิลิตร) นำส่วนน้ำที่กรองได้ไปต้มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที พักให้เย็นจะได้นมถั่วเหลืองและนมงาดำ 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 แยกตะกอนทิ้งนำของเหลวที่ได้คือคีเฟอร์เวย์ไปเข้าเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dry) เพื่อทำให้แห้ง และเก็บคีเฟอร์เวย์แห้งไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไทโรซิเนสและฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อสิวต่อไป

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอ้างอิงจากวิธีของ Srisayam & Chantawannakul (2010) นำตัวอย่างคีเฟอร์เวย์มาทำเป็นสารละลายโดยใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อ เจือจางตัวอย่างคีเฟอร์เวย์ให้ได้ความเข้มข้นที่ 0.5-15 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เตรียมสารละลาย DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl) โดยใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลายให้อยู่ในรูปของอนุมูลอิสระ DPPH ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.01 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ทำการทดสอบโดยการดูดตัวอย่างคีเฟอร์เวย์ 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 IC_{50} คือ ความเข้มของสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% ได้จากการสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % inhibition กับความเข้มข้นของตัวอย่างคีเฟอร์เวย์ที่ใช้

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

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

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 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 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)

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

การวิเคราะห์ทางสถิติ

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

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

การเตรียมตัวอย่างคีเฟอร์เวย์จากนมถั่วเหลืองและนมงาดำ

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

ผลการทดลองนำนมถั่วเหลืองและนมงาดำที่ไม่ผ่านการหมัก ปริมาตร 100 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงและทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักหลังการทำแห้งพบว่านมถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการหมัก (2.49±0.21 g/100 ml ตัวอย่าง) มีน้ำหนักที่ผ่านการทำแห้งมากกว่านมงาดำไม่ผ่านการหมัก (0.20±0.06 g/100 ml ตัวอย่าง) อาจเกิดจากนมถั่วเหลืองมีองค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรต (35%) และโปรตีน (40-41%) มากกว่าและมีปริมาณไขมัน (8.1-24%) ที่น้อยกว่านมงาดำ ขณะที่งาดำมีคาร์โบไฮเดรต โปรตีนและไขมันที่เป็นองค์ประกอบเท่ากับ 10-15% 15-20% และ 45-50% ตามลำดับ (Jeong *et al.*, 2004; Medic *et al*., 2014) ดังนั้นเมื่อทำเป็นน้ำนมองค์ประกอบส่วนใหญ่ของน้ำนมคือคาร์โบไฮเดรตและโปรตีน จึงทำให้น้ำหนักที่ผ่านการทำแห้งของนมงาดำน้อยกว่านมถั่วเหลือง

การทดสอบหมักหัวเชื้อคีเฟอร์กับนมถั่วเหลืองและนมงาดำปริมาตร 100 มิลลิลิตร เมื่อผ่านกระบวนการหมักเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าน้ำหนักที่ผ่านการทำแห้งของคีเฟอร์เวย์จากนมถั่วเหลืองลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับนมถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการหมัก (ตารางที่ 1) เป็นไปได้ว่าจุลินทรีย์มีการใช้สารอาหารจากแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนในนมถั่วเหลืองเพื่อการเจริญ นอกจากนี้แบคทีเรียกลุ่มแลคติกในคีเฟอร์เพิ่มจำนวนขึ้นและมีการสร้างกรดทำให้โปรตีนบางส่วนที่คงเหลือจากการใช้ของจุลินทรีย์ตกตะกอนจึงทำให้น้ำหนักที่ผ่านการทำแห้งหลังการหมักลดลง และเมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักที่ผ่านการทำแห้งของคีเฟอร์เวย์จากนมถั่วเหลืองที่ผ่านการหมักในระยะเวลาต่าง ๆ พบว่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อย อาจเนื่องมาจากจุลินทรีย์ผลิตสารบางชนิดเพิ่มขึ้น หนึ่งในสารดังกล่าวคือสารกลุ่มเอ็กโซโพลีแซ็คคาไรด์ (exopolysaccharide) ซึ่งสารกลุ่มนี้มีลักษณะเป็นเมือกเหนียวหรือข้นหนืดสังเกตได้จากผลิตภัณฑ์นมที่ได้หลังการหมัก จากการศึกษาของ Cerning *et al*. (1994) พบว่าเมื่อใช้กลูโคส 20 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน *Lactobacillus casei* CG11 สามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซ็คคาไรด์ได้สูงถึง 160 มิลลิกรัม/ลิตร สอดคล้องกับงานวิจัยของ Grobben *et al*. (1997) พบว่า *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulkaricus* NCFB 2772 ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนทำให้สามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซ็คคาไรด์ได้ 95 มิลลิกรัม/ลิตร ขณะที่น้ำหนักที่ผ่านการทำแห้งของคีเฟอร์เวย์จากนมงาดำเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับนมงาดำที่ไม่ผ่านการหมัก (ตารางที่ 1) อาจเกิดจากปริมาณสารอาหารจากแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนในนมงาดำมีปริมาณน้อยเพียงพอสำหรับจุลินทรีย์ใช้เป็นสารอาหารเพื่อการเจริญ ในกระบวนการเมตาบอลิซึมและสร้างสารใหม่ขึ้นมาระหว่างการหมักจึงทำให้น้ำหนักที่ผ่านการทำแห้งของคีเฟอร์เวย์จากนมงาดำเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามน้ำหนักที่ผ่านการทำแห้งของคีเฟอร์เวย์จากนมงาดำ ในระยะเวลาการหมักที่ 24 48 และ 72 ชั่วโมง ไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักที่ผ่านการทำแห้งของคีเฟอร์เวย์จากนมถั่วเหลืองและนมงาดำในระยะเวลาการหมักที่ 24 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าที่ระยะเวลาการหมัก 24 และ 48 ชั่วโมง น้ำหนักที่ผ่านการทำแห้งไม่แตกต่างกัน แต่ในระยะเวลาการหมักที่ 72 ชั่วโมง น้ำหนักที่ผ่านการทำแห้งของคีเฟอร์เวย์จากนมถั่วเหลืองสูงกว่าคีเฟอร์เวย์จากนมงาดำ อาจเป็นผลเนื่องจากน้ำหนักที่ผ่านการทำแห้งของคีเฟอร์เวย์ที่ได้จากนมถั่วเหลืองมีแนวโน้มสูงขึ้นตามระยะเวลาการหมักที่เพิ่มขึ้น ซึ่งอาจเกิดจากการที่จุลินทรีย์ในคีเฟอร์สามารถใช้และเปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนเป็นสารเมตาบอไลท์ชนิดใหม่ที่มีขนาดเล็กและไม่สามารถตกตะกอนได้จากการปั่นเหวี่ยงเพิ่มขึ้น จึงทำให้น้ำหนักที่ผ่านการทำแห้งของคีเฟอร์เวย์จากนมถั่วเหลืองมากกว่าน้ำหนักที่ผ่านการทำแห้งของคีเฟอร์เวย์จากนมงาดำในระยะเวลาการหมักที่ 72 ชั่วโมง

ตารางที่ 1 น้ำหนักของตัวอย่างที่ผ่านการทำแห้งของนมถั่วเหลืองและนมงาดำที่ไม่ผ่านการหมักด้วยหัวเชื้อคีเฟอร์และตัวอย่างคีเฟอร์เวย์จากนมถั่วเหลืองและนมงาดำหมักด้วยหัวเชื้อคีเฟอร์ในระยะเวลาหมัก 24 48 และ 72 ชั่วโมง

ชนิดนม	น้ำหนักของตัวอย่างที่ผ่านการทำแห้ง (g/100 ml ตัวอย่าง) (±SD)			
	ไม่ผ่านการหมัก	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
ถั่วเหลือง	2.49±0.21[a]	0.66±0.12[a]	0.74±0.16[a]	0.82±0.09[a]
งาดำ	0.20±0.06[b]	0.50±0.07[a]	0.62±0.11[a]	0.55±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 (sesamolin) และ เซซามอล (sesamol) ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระประสิทธิภาพสูง ส่วนถั่วเหลืองมีสารไอโซฟลาโวน (isoflavone) ให้ผลในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Srisayam *et al*., 2014; Muji**ć** *et al*., 2011) เมื่อทำการหมักนมในระยะเวลาที่แตกต่างกัน ผลของการหมักส่งผลให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ผ่านการหมัก และค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้นตามระยะเวลาในการหมักที่เพิ่มขึ้นทั้งคีเฟอร์เวย์จากนมถั่วเหลืองและนมงาดำ ซึ่งปัจจัยที่อาจทำให้เกิดผลดังกล่าวเนื่องจากจุลินทรีย์ในคีเฟอร์มีการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนในนมธัญพืชจากการทำงานของเอนไซม์ในกระบวนการไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ได้คีเฟอร์แรน (kefiran) และโปรตีนไฮโดรไลเซท (protein hydrolysate) ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (De Oliveira *et al*., 2015; Korhonen, 2009) โดยมีรายงานว่าคีเฟอร์แรนและโปรตีนไฮโดรไลเซทมีผลต่อต้านอนุมูลอิสระได้หลายกลไก 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 แม้จะมีการรายงานว่า

ถั่วเหลืองและงาดำมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียโดยทำการทดสอบจากสารสกัดที่สกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (Nigam *et al*., 2015; Laodheerasiri & Pathirage, 2017) แต่จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากงาและถั่วเหลืองมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียได้ (Das *et al*., 2012; Joo *et al*., 2004) ในถั่วเหลืองมีรายงานว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จาก glycinin และ β-conglycinin (soy protein isolates, SPIs) มีฤทธิ์ยับยั้ง *Escherichia coli* ATCC 26922 ได้ไม่แตกต่างกัน ขณะที่โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จาก glycinin ยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 *Salmonella enterica* ATCC 13312 *Klebsiella pneumonie* ATCC 13883 *Streptococcus mutans* ATCC 25175 และ *Propionibacterium acnes* ATCC 6919 ได้ดีกว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จาก β-conglycinin (Vasconcellos *et al*., 2014) ดังนั้นในการยับยั้งแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดของคีเฟอร์เวย์จากนมถั่วเหลืองและนมงาดำน่าจะเกิดจากโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากโปรตีนในธัญพืชและจุลินทรีย์ในคีเฟอร์ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพขึ้นมาเพื่อยับยั้งแบคทีเรีย เช่น คีเฟอร์แรน แบคเทอริโอซิน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และกรดอินทรีย์ แต่ปริมาณมากน้อยขึ้นอยู่กับชนิดของนมที่ใช้ในการหมัก

จากการวัดค่า pH ของคีเฟอร์เวย์จากนมถั่วเหลืองและนมงาดำที่ผ่านกระบวนการหมักนาน 72 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับเวย์ที่ได้จากนมถั่วเหลืองและนมงาดำที่ไม่ผ่านการหมัก พบว่าคีเฟอร์เวย์จากนมถั่วเหลืองและนมงาดำที่ไม่ผ่านการหมักมีค่า pH เท่ากับ 6.37 และ 6.17 ตามลำดับ ในขณะที่คีเฟอร์เวย์ที่ได้จากการหมักนมถั่วเหลืองและนมงาดำมีค่า pH เท่ากับ 4.6 และ 4.75 ตามลำดับ ค่า pH ที่ลดลงแสดงถึงปริมาณกรดอินทรีย์ที่เพิ่มขึ้นเมื่อผ่านกระบวนการหมัก ดังนั้นการเพิ่มขึ้นของกรดในตัวอย่างคีเฟอร์เวย์จึงเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้คีเฟอร์เวย์จากนมถั่วเหลืองและนมงาดำแสดงฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบได้ อย่างไรก็ตามเพื่อเป็นการยืนยันผลของกรดอินทรีย์ที่มีต่อการยับยั้งแบคทีเรียควรมีการปรับ pH ของคีเฟอร์เวย์ก่อนการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียเทียบกับตัวอย่างคีเฟอร์เวย์ที่ไม่ได้ปรับ pH การที่คีเฟอร์เวย์จากนมถั่วเหลืองและนมงาดำมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียที่แตกต่างกันนั้น อาจเป็นผลมาจากความแตกต่างของชนิดโปรตีนไฮโดรไลเซท คีเฟอร์แรนและแบคเทอริโอซินในตัวอย่างคีเฟอร์เวย์ ดังนั้นควรทำการทดสอบเพิ่มเติมเพื่อยืนยันฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียของคีเฟอร์เวย์ว่าเกิดจากโปรตีนไฮโดรไลเซท คีเฟอร์แรนและแบคเทอริโอซิน รวมทั้งระบุชนิดคีเฟอร์แรนและแบคเทอริโอซินที่ได้จากคีเฟอร์เวย์นมถั่วเหลืองและนมงาดำในการศึกษาต่อไป

มีรายงานว่าคีเฟอร์มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย รา และยีสต์ก่อโรคได้ (Lopitz *et al*., 2006; Ismaiel *et al*., 2011; Bolla *et al*., 2013) โดยจุลินทรีย์ในคีเฟอร์จะผลิต คีเฟอร์แรน แบคเทอริโอซิน กรดแลคติก กรดอะซิติก และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เพื่อยับยั้งเชื้อก่อโรค (Mishra & Lambert, 1996) คีเฟอร์แรน สารประเภทเอ็กโซโพลีแซ็คคาไรด์สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้หลายชนิด (Rodrigues *et al*., 2005; Jenab *et al*.,2017) แบคเทอริโอซินเป็นที่รู้จักกันดีในอุตสาหกรรมอาหาร ซึ่งนำมาใช้ในการถนอมอาหารโดยสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียและจุลินทรีย์ก่อโรคได้ และยอมรับว่าเป็นสารที่มีความปลอดภัย (generally recognized assafe, GRAS) ตัวอย่างแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* มีชื่อว่า ไนซิน (nisin) ถูกนำมาใช้ในหลายประเทศ (Cleveland *et al*., 2001; da Silva Malheiros *et al*., 2010) โดยแบคเทอริโอซินเป็นโปรตีนหรือเปปไทด์ที่ถูกผลิตมาจากแบคทีเรียกลุ่มแลคติกมีกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งและฆ่าแบคทีเรียอื่นโดยทำให้เกิดรูบนเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย (Ennahar *et al*., 1999) Garrote *et al*. (2000) พบกรดอินทรีย์ ได้แก่ กรดแลคติกและกรดอะซิติกที่ได้จากการหมักนมด้วยคีเฟอร์มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย และจากการทดสอบพบว่ากรดอินทรีย์สามารถ

ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ Yüksekdağ *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 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	NA	NA	NA
นมถั่วเหลืองหมัก 72 ชั่วโมง	9±0.00	10.33±0.58	12.00±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 µg/ml)	34.67±0.58	34.67±0.58	34.67±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[b]
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 และพบว่าคีเฟอร์เวย์จากนมถั่วเหลืองและนมงาดำที่ได้จากการหมักนาน 72 ชั่วโมง แสดงฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ได้ไม่แตกต่างกัน (p=0.248) โดยมี % inhibition เท่ากับ 48.41±0.33% และ 48.99±0.19% ตามลำดับ (ตารางที่ 5) การศึกษาในคีเฟอร์นมแพะพบว่า ความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไทโรซิเนสของคีเฟอร์เวย์เกิดจากองค์ประกอบของเปบไทด์ และกรดแลคติกซึ่งเป็นสารที่แบคทีเรียกลุ่มแลคติกในคีเฟอร์ผลิตขึ้นในระหว่างการหมักนม มีการทดสอบใช้คีเฟอร์เวย์ กรดแลคติกและเปบไทด์ ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่าสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้โดยผ่านกลไกการจับกับคอปเปอร์ (Cu) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ไทโรซิเนส ทำให้เอนไซม์เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไป จึงสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทไรซิเนสได้ (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]
นมงาดำที่หมัก72 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 จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้ทราบว่าระยะเวลาในการหมักที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีในการทดลองนี้คือ 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.

Ismaiel, 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.

Muji**ć**, I., Šertovi**ć**, E., Joki**ć**, S., Sari**ć**, Z., Alibabi**ć**, V., Vidovi**ć**, S., & Živkovi**ć**, 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 cid bacteria: 1. Oxygen metabolites and catabolism en-products. *Lait*, *71*, 525-541.

Rekha, C., & Vijayalakshmi, G. (2008). Biomolecules and nutritional Qqality of soymilk fermented with probiotic yeast and bacteria. *Applied Biochemistry and Biotechnolgy, 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 kefiran 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 kefirs 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.