องค์ประกอบเรซิ่น ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียของเบียร์ และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดฮอปส์

Composition of Hops Resin Extracts and Their Anti Beer Spoilage Microorganisms and Antioxidant Activities

กริษฐา เดชวัน[1] , กิรติกานต์ มุ่งกลาง[1] ภาณุพงศ์ สุ่มหิรัญ[1] และ มงคล เพ็ญสายใจ[1]
Dechwan, K.[1], Mungklang, K.[1], Sumhirun, P.[1] and Phensaijai, M.[1]

Abstract

Composition analysis of three hops; Cascade, Centennial and Saaz, resin extracts by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC), results showed that percentage of the most total α acid and total β acid of Saaz were 11.02 and 5.73 respectively, followed by Cascade and Centennial were 10.50, 5.10 and 10.20, 3.59 respectively. Cascade was the most effective antimicrobial against *Lactobacillus brevis* TISTR 855 *Pediococcus damnosus* WLP661 *Staphylococcus aureus* TISTR 746 and *Escherichia coli* TISTR 074. The minimum inhibition concentration (MIC) of Cascade was 3.125-6.25 mg/ml while Saaz and Centennial were 6.25 – 12.5 mg/ml. All three hops extracts had no antimicrobial impact on *Brettanomyces lambicus* WLP 653. Antioxidant activity by DPPH radical scavenging method of Saaz was the most efficient scavenger, with an IC_{50} value of 0.5893 mg/ml, while IC_{50} of Cascade and Centennial hops extracts were 0.6412 and 0.6482 mg/ml respectively.

Keywords: Hops resin, Beer spoilage, Antimicrobial activity, Antioxidant activity

บทคัดย่อ

การวิเคราะห์องค์ประกอบเรซิ่นของสารสกัดฮอปส์ 3 สายพันธุ์ได้แก่ Cascade Centennial และSaaz ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) พบว่า สายพันธุ์ Saaz มีค่ากรดแอลฟารวมและกรดบีตารวมมากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 11.02 และ5.73 ตามลำดับ รองลงมาคือสายพันธุ์ Cascade คิดเป็นร้อยละ 10.50 และ5.10 ตามลำดับ ขณะที่สายพันธุ์ Centennial มีค่าน้อยที่สุด คิดเป็นร้อยละ 10.20 และ3.59 ตามลำดับ ฮอปส์สายพันธุ์ Cascade มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *Lactobacillus brevis* TISTR 855 *Pediococcus damnosus* WLP661 *Staphylococcus aureus* TISTR 746 และ *Escherichia coli* TISTR 074 สูงสุด มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ (MIC) เท่ากับ 3.125 - 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือสายพันธุ์ Saaz และCentennial มีค่า MIC เท่ากับ 6.25 - 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่ฮอปส์ทั้ง 3 สายพันธุ์ไม่สามารถยับยั้ง *Brettanomyces lambicus* WLP 653 และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging พบว่าสายพันธุ์ Saaz มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.5893 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่สายพันธุ์ Cascade และCentennial มีประสิทธิภาพรองลงมา มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.6412 และ0.6482 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

คำสำคัญ: เรซิ่นของฮอปส์ การเน่าเสียของเบียร์ ฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

คำนำ***

ฮอปส์ (*Humulus lupulus)* เป็นพืชที่นิยมนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์ โดยช่อดอกของฮอปส์เพศเมียมีต่อม Lupulin ที่มีสารประกอบต่าง ๆ เช่น resin bitter acid (กรดขม) น้ำมันหอมระเหย และฟลาโวนอยด์ โดยที่สารประกอบเหล่านี้มีบทบาทสำคัญในกระบวนการผลิตเบียร์ สารประกอบช่วยในการเก็บรักษาและให้สารให้ความขม (Karabin และคณะ, 2015) ซึ่ง bitter acid resin bitter acid (กรดขม) โดยทั่วไปจำแนกเป็น กรดแอลฟาและกรดบีตา ที่สำคัญที่สุดคือ humulone และ lupulone ตามลำดับ (Zanoli และ Zavatti, 2008) โดยกรดแอลฟาหรือฮิวมูโลนเป็นสารประกอบที่ในระหว่างการต้มเบียร์ (น้ำมอลต์) ฮิวมูโลนจะถูกไอโซเมอไรซ์ได้เป็นกรดไอโซแอลฟาหรือไอโซฮิวมูโลน ซึ่งมีหน้าที่ทำให้เบียร์มีรสขม (Keukeleire, 2020) และกรดบีตาหรือลิวพูโลนมีหน้าที่สำหรับให้กลิ่นของเบียร์ (Ortega-Heras และคณะ, 2003) และนอกจากรสขมของฮอปส์จะมีผลต่อรสสัมผัสและกลิ่นของเบียร์แล้วยังมีประสิทธิภาพในการป้องกันการเน่าเสียของเบียร์ได้ เนื่องจากพบว่าสารสำคัญในฮอปส์มีความสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ (Natarajan และคณะ, 2008) และยังมีรายงานว่าฮอปส์มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระอีก

[1] [1]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร 10520
[1] Department of biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang Bangkok

ด้วย (Abram และคณะ, 2015)

วัตถุดิบหลักในการผลิตเบียร์ประกอบด้วย มอลต์ ฮอปส์ ยีสต์และน้ำ ส่วนใหญ่เบียร์จะต้องเก็บในอุณหภูมิต่ำ ถ้าเก็บในสภาวะที่ไม่เหมาะสมจะส่งผลต่อคุณภาพของเบียร์หรือเกิดปัญหาการเน่าเสียทางจุลินทรีย์ได้ โดยจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสียของเบียร์ เช่น แบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Staphylococcus aureus, Lactobacillus brevis* และ*Pediococcus damnosus* ยีสต์ ได้แก่ *Brettanomyces lambicus* รวมไปถึงแบคทีเรียแกรมลบในกลุ่มของ Enterobacteriaceae ได้แก่ *Escherichia coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถปนเปื้อนในเบียร์และก่อให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหารสำหรับผู้บริโภคได้

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงศึกษาองค์ประกอบสารสกัดฮอปส์ ประสิทธิภาพในการยั้บยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียของเบียร์ และประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดฮอปส์ ในฮอปส์ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ Cascade Centennial และSaaz ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก Chiang Rai Hop Yard

อุปกรณ์และวิธีการ**

นำดอกฮอปส์แห้ง 3 สายพันธุ์ คือ Cascade, Centennial และSaaz ได้รับความอนุเคราะห์จาก Chiang Rai Hop Yard โดยใช้ดอกแห้งปริมาณ 100 กรัม (Zeković และคณะ, 2006) สกัดสารประกอบเรซิ่น ด้วยตัวทำละลาย (solvent extraction) โดยการนำตัวอย่างฮอปส์ ปริมาณ 10 ± 0.001 กรัม ผสมกับสารละลาย diethyl ether–methanol-HCl 0.1 M (100 : 20 : 40 v / v / v) เขย่าเป็นเวลา 40 นาที และตั้งทิ้งไว้จนแยกเป็นสองส่วน คือ ส่วนใส (Supernatant) และส่วนตะกอน นำส่วนใสไปเจือจาง 10 เท่า ด้วย methanol นำไปตรวจหาสารประกอบเรซิ่นด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography ; HPLC); C18 column (SHIMADZU รุ่น LC-20AD) Forteschi และคณะ, 2018) ในส่วนที่ 2 จะนำไประเหยที่เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (Heidolph รุ่น Hei-VAP Gold 3 Rotary Evaporator) เพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารสกัด ฮอปส์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (Minimum Inhibition Concentration : MIC) ดัดแปลงจากสุภาวดี และคณะ, (2562) เมื่อทดสอบในด้านการยับยั้งเบื้องต้นแล้ว นำสารสกัดที่ใช้ในการศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้น 25, 12.5 , 6.25 และ3.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาทดสอบอย่างละเอียดมากขึ้นโดยใช้วิธี macro broth dilution โดยปิเปตอาหาร NB ลงยังหลอดทดลอง ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ปิเปตสารสกัดฮอปส์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 4 มิลลิลิตร และปิเปตสารละลายเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงยังหลอดทดลองที่มีอาหาร NB อยู่ ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (vortex mixer) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ตรวจผลโดยการดูความขุ่น การวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารสกัดฮอปส์ที่สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Bactericidal Concentration : MBC) ดัดแปลงจาก สุภาวดี และคณะ (2562) นำความเข้มข้นของสารสกัดฮอปส์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจากการทดสอบ MIC ที่ไม่พบความขุ่นมาใช้ในการทดสอบ โดยการ streak plate ลงอาหารเลี้ยงเชื้อ ลงอาหารเลี้ยงเชื้อ ตรวจผลโดยดูการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้วิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ดัดแปลงจากวิธีของ Pinela และคณะ (2012) โดยนำสารสกัดฮอปส์มาทำการเจือจางในระดับความเข้มข้น 0.125, 0.250, 0.500 และ1.000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยเมทานอลจากนั้นปิเปตสารสกัด (หรือสารมาตรฐาน) แต่ละความเข้มข้นปริมาตร 30 ไมโครลิตร ลงเพลทขนาด 96 หลุม และเติมสาร DPPH ปริมาตร 270 ไมโครลิตร นำไปบ่มในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที ซึ่งสารละลายนี้มีสีม่วง จึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตรด้วยเครื่อง microplate Reader โดยใช้สาร ascorbic acid (Vitamin C) เป็นสารละลายมาตรฐาน และใช้สารละลายเมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 เป็นแบลงค์ โดยทำการทดสอบวิธีเดียวกับสารสกัดฮอปส

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง***

Table 1 : Species of hops and the percentage of compounds

Spicies	Percentage of compounds					
	co-α	n+ad-α	co-β	n+ad-β	Total α acid	Total β acid
Cascade	3.99	6.51	1.89	3.21	10.50%	5.10%
Centennial	3.74	6.46	1.76	1.83	10.20%	3.59%
Saaz	3.99	6.51	1.89	3.21	10.50%	5.10%

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบเรซิ่นของสารสกัดฮอปส์ทั้ง 3 สายพันธุ์ได้แก่ Cascade Centennial และSaaz จาก Chiang Rai hop Yard โดยเรซิ่นหรือสารให้ความขมนี้ แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกคือ กรดแอลฟาประกอบด้วย co-α และ n+ad-α กลุ่มที่ 2 คือ กรดบีตา ประกอบด้วย co-β และ n-ad-β พบว่าฮอปส์สายพันธุ์ Saaz มีร้อยละของ co-α, n+ad-α,

co-β และn+ad-β มากที่สุด ที่ร้อยละ 4.18, 6.84, 2.08 และ 3.65 ตามลำดับ มีค่าร้อยละของ กรดแอลฟาและกรดบีตา เท่ากับ 11.02 และ 5.73 รองลงมาคือ ฮอปส์สายพันธุ์ Cascade มีร้อยละของ co-α, n+ad-α, co-β และn+ad-β เท่ากับ 3.99, 6.51, 1.89 และ 3.21 ตามลำดับ และมีค่าร้อยละของกรดแอลฟาและกรดบีตา เท่ากับ 10.50 และ 5.10 และ ฮอปส์สายพันธุ์ Centennial มีร้อยละของ co-α, n+ad-α, co-β และn+ad-β น้อยที่สุด ที่ร้อยละ 3.74, 6.46, 1.76 และ 1.83 ตามลำดับ มีค่าร้อยละของกรดแอลฟาและกรดบีตา เท่ากับ 10.20 และ 3.59 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Forteschi และคณะ, (2019) ที่ศึกษาเกี่ยวกับการประเมินคุณภาพของ ฮอปส์สายพันธุ์ Cascade ที่เจริญในเมือง โดมุสโนวาส จังหวัด ซาร์ดิเนีย ประเทศอิตาลี ที่เก็บเกี่ยวในปี 2015 พบว่ามีร้อยละของ กรดแอลฟาและกรดบีตา เท่ากับ 9.05 และ 5.26 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับ ฮอปส์จากจังหวัดเชียงราย ตอนเหนือของประเทศไทย จากการวิเคราะห์หาความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารสารสกัดฮอส์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ *Lactobacillus brevis TISTR 855 Pediococcus damnosus WLP661 Staphylococcus aureus TISTR 746 Escherichia coli TISTR 074* และ*Brettanomyces lambicus* ผลปรากฏว่าค่า MIC ของสารสกัดฮอปส์สายพันธุ์ Cascade มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *L. brevis* TISTR 855 *P. damnosus* WLP661 *S. aureus* TISTR 746 และ*E. coli* TISTR 074 สูงสุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 3.125 - 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือสายพันธุ์ Saaz และCentennial มีค่า MIC เท่ากับ 6.25 - 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ฮอปส์ทั้ง 3 สายพันธุ์ไม่สามารถยับยั้ง *B. lambicus* WLP 653 ได้ การวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารสกัดที่สามารถทำลายเชื้อจุลินทรีย์ ผลปรากฏว่าค่า MBC พบว่าสารสกัดฮอปส์สายพันธุ์ Cascade มีประสิทธิภาพในการทำลาย *L. brevis* TISTR 855 *P. damnosus* WLP661 *S. aureus* TISTR 746 และ*E. coli* TISTR 074 สูงสุด โดยมีค่า MBC เท่ากับ 6.25 - 12.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือสายพันธุ์ Saaz และCentennial มีค่า MBC เท่ากับ 12.5 - 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ฮอปส์ทั้ง 3 สายพันธุ์ไม่สามารถทำลาย *B. lambicus* WLP 653 ได้ เมื่อพิจารณาค่า MIC และMBC ของสารสกัดฮอปส์ทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งหรือทำลายแบคทีเรียแกรมบวกได้มากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Nionelli และคณะ (2018) และ Abram และคณะ (2015) ที่ทำการศึกษาสารสกัดฮอปส์ทางด้านฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ พบว่าสารสกัดฮอปส์ส่วนใหญ่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก แต่ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบหรือได้เพียงบางชนิด เช่น *E. coli* O157: H7 ผลการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH scavenging activity พบว่า สารสกัดฮอปส์สายพันธุ์ Saaz มีประสิทธิภาพในการดักจับอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.5893 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สารสกัดฮอปส์สายพันธุ์ Cascade และCentennial มีประสิทธิภาพในการดักจับอนุมูลอิสระรองลงมา โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.6412 และ0.6482 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งค่า IC_{50} ของสารสกัดฮอปส์ทั้งสามชนิด สอดคล้องกับงานวิจัยของ Alonso-Esteban และคณะ (2019) ที่ทำการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระของสารสกัดฮอปส์ด้วยวิธี DPPH พบว่าที่ความเข้มข้นของสารสกัดฮอปส์ 2.5 - 0.039 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.5050 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สรุปผล

การวิเคราะห์องค์ประกอบเรซิ่น การทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์และการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ พบว่าฮอปส์ทั้ง 3 สายพันธุ์มีประสิทธิภาพในการดักจับอนุมูลอิสระ และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียของเบียร์ได้บางชนิด โดยสายพันธุ์ Saaz มีร้อยละของสารประกอบเรซิ่นและมีประสิทธิภาพในการดักจับอนุมูลอิสระมากที่สุด และสายพันธุ์ Cascade มีประสิทธิภาพในการยับยั้งและทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียของเบียร์มากที่สุด

คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ Chiang Rai Hop Yard ที่สนับสนุนดอกฮอปส์ในการทำการวิจัย และขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในการสนับสนุนการทำวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง***

สุภาวดี พาหนะ อติมา วงศ์สาโรจน์ และอันภิญัฐชา สุขเทพ, 2562,การศึกษาสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์จากสารสกัดหยาบเอทานอลของกระถิน,ปริญญานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

Abram, V., Čeh B., Vidmar M., Hercezi, M., Lazić N., Bucik, V., Možina, S.S., Košir I. J., Kač, M., Demšar L. and Ulrih, N. P., 2015, A comparison of antioxidant and antimicrobial activity between hop leaves and hop cones, Industrial Crops and Products, 64 : 124–134.

Alonso-Esteban,J. I., Pinela, J., Barros, L., Ćirić, A., Soković, M., Calhelha, R. C., Torija-Isasa, E., Sánchez-Mata, M.D. C. and Ferreira, I. C.F.R., 2019, Phenolic composition and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic properties of hop (*Humulus lupulus* L.) Seed, Ind Crops and Products. 134 : 154-159.

Keukeleire, D.D., 2000, Fundamentals of beer and hop chemistry, *Química Nova*, *23*(1) : 108–112.

Forteschi, M., Porcu, M. C., Fanari, M., Zinellu, M., Secchi, N., Buiatti, S., Passaghe, P., Bertoli, S. and Pretti, L. 2018, Quality assessment of Cascade Hop (*Humulus lupulus* L.) grown in Sardinia, European Food Research and Technology, 245 : 863-871.

Karabĺn M., Hudcová, T., Jelĺnek, L., and Dostálek P., 2015, Biotransformations and biological activities of hop flavonoids, Biotechnology Advances, 33 : 1063–1090.

Komaitis, M and Proestos, C., 2009, Beer in Health and Disease Prevention, Athens : Elsevier Inc.

Natarajan, P. Katta, S. Andrei, I., Ambati, V.B.R., Leonida, M., Haas, G.J., 2008, Positive antibacterial co-action between hop (*Humulus lupulus*) constituents and selected antibiotics, Phytomedicine, 15 : 194–201.

Ortega-Heras, M., González-Sanjosé, M.L. and Caballero, B., 2003, BEERS | Wort Production,. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition), Academic Press : 429–434.

Pinela, J., Barros, L., Dueñas, M., Carvalho, M.A., Santos-Buelga, C. and Ferreira, C.F.R. I., 2012, Antioxidant activity, ascorbic acid, phenolic compounds and sugars of wild and commercial *Tuberaria lignosa* samples: Effects of drying and oral preparation methods, Food Chemistry 135 : 1028-1035.

Zanoli, P. and Zavatti, M., 2008, Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L, Journal of Ethnopharmacology,116 : 383–396.

Zeković, Z., Pfaf - Šovljansky, I. and Grujić, O., 2006, Supercritical fluid extraction of hops, Journal of the Serbian Chemical Society, 72 : 81-87.