

ผลของ *Lactobacillus casei* (TISTR 1463) และ *Lactobacillus acidophilus* (TISTR 1336)
ต่อปริมาณวิตามินซี ฟีนอลิก และสารต้านอนุมูลอิสระในน้ำชาเขียว
Effect of *Lactobacillus casei* (TISTR 1463) and *Lactobacillus acidophilus* (TISTR 1336)
on Vitamin C, Phenolic and Antioxidant Contents in Green Tea Beverage

พริมา พิริยางกูร¹ อชิรญา แก่นจันทร์¹ และ จุฑาทิพย์ โพธิ์อุบล²
Phiriyangkul, P.¹, Kanchan, A.¹ and Poubol, J.²

Abstract

The objectives of this research were to study on the effect of probiotic bacteria *Lactobacillus casei* (TISTR 1463) and *Lactobacillus acidophilus* (TISTR 1336) on vitamin C, phenolic compound, and antioxidant content of green tea. Each strain of probiotic bacteria was added to the green tea that brewed with boiled water. Un-inoculate green tea sample was used as control. The green tea was filled in a sterile plastic bottle and stored at 4°C. Vitamin C, phenolic compound and antioxidant content in green tea were investigated every week. It was found that green tea inoculated with both probiotic strains had a significantly increased of vitamin C content ($P<0.05$) at 3, 4 and 6 weeks of storage. Whereas phenolic contents were not significantly different from the control sample, the antioxidant content of green tea inoculated with *L. casei* was higher than the others ($P<0.05$).

Keywords: probiotic bacteria, vitamin C, phenolic compound, antioxidant

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลโปรไบโอติกแบคทีเรีย *Lactobacillus casei* (TISTR 1463) และ *Lactobacillus acidophilus* (TISTR 1338) ต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณวิตามินซี สารประกอบฟีนอล และสารต้านอนุมูลอิสระในน้ำชาเขียว โดยเติมเชื้อโปรไบโอติกแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ลงในน้ำชาเขียวที่ผ่านการชงด้วยน้ำต้มสุก เปรียบเทียบกับน้ำชาเขียวที่ไม่ได้เติมเชื้อโปรไบโอติกแบคทีเรีย (ชุดควบคุม) จากนั้นบรรจุน้ำชาเขียวลงในขวดพลาสติกที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตรวจสอบวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินซี สารประกอบฟีนอล และสารต้านอนุมูลอิสระในน้ำชาเขียวทุกสัปดาห์ จากการทดลองพบว่าน้ำชาเขียวที่เติมเชื้อโปรไบโอติกทั้ง 2 สายพันธุ์ มีปริมาณวิตามินซีเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ในสัปดาห์ที่ 3 4 และ 6 ของการเก็บรักษาเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ในขณะที่ปริมาณสารประกอบฟีนอลไม่แตกต่างจากชุดควบคุม ส่วนปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในน้ำชาเขียวที่เติม *L. casei* มีมากกว่าในน้ำชาเขียวที่เติม *L. acidophilus* และชุดควบคุม ($P<0.05$)

คำสำคัญ: โปรไบโอติกแบคทีเรีย วิตามินซี สารประกอบฟีนอล สารต้านอนุมูลอิสระ

คำนำ

ชาเขียวจากใบ *Camellia sinensis* เป็นเครื่องดื่มที่ได้รับความนิยมบริโภคทั่วโลก เนื่องจากการบริโภคชาเขียวมีประโยชน์ต่อสุขภาพมากมาย (Pinto, M. de S., 2013) เช่น ลดคอเลสเตอรอล ป้องกันโรคหัวใจและหลอดเลือด ต้านมะเร็ง ต้านเบาหวาน ต้านโรคอ้วน ต้านเชื้อแบคทีเรีย และต้านไวรัส (Suzuki และคณะ., 2012) คุณสมบัติที่ส่งผลดีต่อสุขภาพส่วนใหญ่ได้มาจาก คาเทชิน (catechins; flavan-3-ol) ซึ่งเป็นสารประกอบพอลิฟีนอลฟลาโวนอยด์ (polyphenolic flavonoids) หลักที่พบในชา (Musial. และคณะ., 2020) มีสารประกอบฟีนอลิกปริมาณสูงซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Lorenzo และ Munekata, 2016) ชาเขียวนิยมใช้เป็นสารเติมแต่ง กลิ่นและรสชาติจากธรรมชาติ ช่วยยืดอายุการเก็บรักษา นำเสนอภาพลักษณ์ที่ดีต่อสุขภาพแก่ผู้บริโภค และช่วยยับยั้งเชื้อก่อโรคโดยไม่ทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติก (Lactic

¹ สาขาวิชาชีวเคมี ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

Division of Biochemistry, Department of Science, Faculty of Liberal Arts and Science, Kasetsart University, KamphaengSaen Campus, NakhonPathom 73140

² สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

Division of Microbiology, Department of Science, Faculty of Liberal Arts and Science, Kasetsart University, KamphaengSaen Campus, NakhonPathom 73140

acid bacteria, LAB) (Wang. และคณะ, 2003) การผสมผงชาเขียวในโยเกิร์ตสามารถเพิ่มผลดีต่อสุขภาพ โดยการเพิ่มฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ส่งเสริมการเจริญเติบโตของ LAB และเพิ่มฤทธิ์ด้านการอักเสบ (Jeong และคณะ, 2018) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลโปรไบโอติกแบคทีเรีย *Lactobacillus casei* (TISTR 1463) และ *Lactobacillus acidophilus* (TISTR 1338) ต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณวิตามินซี สารประกอบฟีนอล และสารต้านอนุมูลอิสระในน้ำชาเขียว เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์

อุปกรณ์และวิธีการ

เตรียมน้ำชาเขียว (*Camellia sinensis* Linn.) โดยต้มชาเขียวอบแห้ง (มูลนิธิคนสร้างชาติ จังหวัดนครปฐม) 60 กรัม ในน้ำเดือด (100 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 7 ลิตร นาน 10 นาที จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง กรองเอาแต่ส่วนใส และแบ่งน้ำชาเขียวออกเป็น 3 ชุดทดลอง โดยชุดที่ 1 เป็นน้ำชาเขียวที่ไม่มีการเติมเชื้อโปรไบโอติก (ชุดควบคุม) ชุดที่ 2 เป็นน้ำชาเขียวที่เติมเชื้อ *L. casei* (TISTR 1463) ชุดที่ 3 เป็นน้ำชาเขียวที่เติมเชื้อ *L. acidophilus* (TISTR 1336) โดยมีความเข้มข้นของเชื้อโปรไบโอติก เท่ากับ 1.4×10^8 CFU/ml จากนั้นบรรจุลงในขวดพลาสติกที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วขนาด 220 มิลลิลิตร ปิดฝาให้สนิท แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ วิเคราะห์ปริมาณวิตามิน ซี ฟีนอลิก และสารต้านอนุมูลอิสระในน้ำชาเขียวทั้ง 3 ชุด ทุกสัปดาห์ จำนวน 3 ซ้ำ วิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ferric reducing antioxidant power (FRAP) (Benzie และ Strain, 1996) โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน 2 ชนิด คือ วิตามิน ซี และวิตามิน อี เพื่อเป็นตัวแทนสำหรับสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถละลายน้ำและไขมัน ตามลำดับ วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก โดยวิธี Folin-Ciocalteu (Singleton และคณะ, 1999) แล้วเทียบกับกราฟมาตรฐานแกลลิก แอซิด วิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางสถิติของผลการทดลอง เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย ด้วย Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P < 0.05$)

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

เมื่อเก็บรักษาน้ำชาเขียว (ชุดควบคุม) น้ำชาเขียวที่เติมเชื้อ *L. casei* และน้ำชาเขียวที่เติมเชื้อ *L. acidophilus* ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าปริมาณวิตามินซีใน 3 ชุดทดลองมีปริมาณน้อยที่สุดเมื่อเริ่มต้น และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยมีปริมาณสูงสุดที่สัปดาห์ที่ 3 ของการเก็บรักษา หลังจากนั้นปริมาณวิตามินซีจะลดลง ในสัปดาห์สุดท้ายของการเก็บรักษา พบว่าน้ำชาเขียวที่เติมเชื้อ *L. casei* และน้ำชาเขียวที่เติมเชื้อ *L. acidophilus* มีปริมาณวิตามินซีเท่ากับ 13.58 และ 17.64 กรัมต่อน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (Figure 1A) ในขณะที่ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกใน 3 ชุดทดลองมีค่ามากที่สุดเมื่อเริ่มต้น และมีแนวโน้มลดลงตามอายุการเก็บรักษาจนถึงสัปดาห์ที่ 3 หลังจากนั้นปริมาณสารประกอบฟีนอลิกจะเพิ่มขึ้นในสัปดาห์ที่ 4 ($p < 0.05$) แล้วลดลงตลอดอายุการเก็บรักษา ทั้งนี้ปริมาณฟีนอลิกในน้ำชาเขียว (ชุดควบคุม) และน้ำชาเขียวที่เติมเชื้อทั้งสองชนิดมีแนวโน้มเหมือนกันตลอด 6 สัปดาห์ของการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ($p \geq 0.05$) สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงปริมาณฟีนอลิกในชาโยเกิร์ต (Jeong และคณะ, 2018) ซึ่งเกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมจากจุลินทรีย์ที่มีการสร้างสารประกอบฟีนอลิกใหม่ระหว่างการสร้างกรดของแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก (LAB) ส่งผลให้ปริมาณสารฟีนอลิกเพิ่มสูงขึ้น (Blum, U., 1998) ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตลอดอายุการเก็บรักษา มีค่าสูงสุดที่สัปดาห์สุดท้ายของการเก็บรักษา โดยมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในน้ำชาเขียว น้ำชาเขียวที่เติมเชื้อ *L. casei* และ *L. acidophilus* เท่ากับ 3.52 ± 0.07 , 4.34 ± 0.12 และ 3.42 ± 0.17 mg/ml, เทียบเท่ากับวิตามินอี 3.01 ± 0.06 , 3.37 ± 0.21 และ 2.91 ± 0.01 เทียบเท่ากับมิลลิกรัมวิตามินซีต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในน้ำชาเขียวที่เติมเชื้อ *L. casei* จะมีปริมาณมากกว่าน้ำชาเขียวที่เติมเชื้อ *L. acidophilus* และชุดควบคุม ($p < 0.05$) Leiko (2014), Muniandy และคณะ (2016) และ Jeong และคณะ (2018) ที่พบว่าการผสมชาเขียวในโยเกิร์ตหรือนมที่ผสมโปรไบโอติกจะช่วยเพิ่มคุณประโยชน์ โดยการเพิ่มฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ส่งเสริมการเจริญของ LAB และช่วยป้องกันการอักเสบได้ ทั้งนี้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่เพิ่มขึ้นในโยเกิร์ต อาจเนื่องมาจากเปปไทด์ที่ได้จากการหมักของ LAB และสารประกอบฟีนอลิก

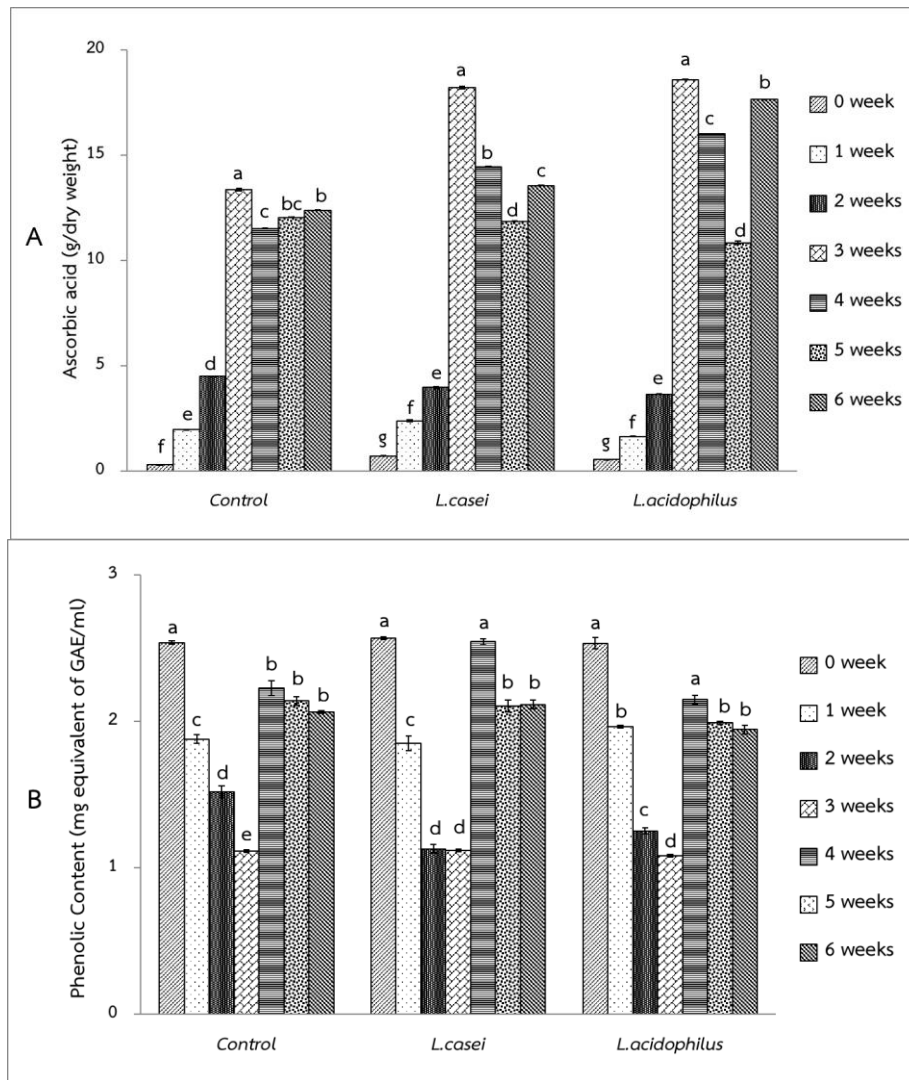


Figure 1 Ascorbic acid (A) and phenolic content (B) in green tea (control), green tea with *Lactobacillus casei* (TISTR 1463) or *Lactobacillus acidophilus* (TISTR 1336) after storage at 4°C for 6 weeks.

สรุปผล

ปริมาณวิตามินซี ฟีนอลิกและสารต้านอนุมูลอิสระในน้ำชาเขียวที่เติม *L. casei* และน้ำชาเขียวที่เติม *L. acidophilus* มีแนวโน้มเหมือนกับชุดควบคุม เมื่อเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส 6 สัปดาห์ โดยปริมาณวิตามินซีในน้ำชาเขียวที่เติมโพรไบโอติกทั้งสองสายพันธุ์จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นในสัปดาห์ที่ 3 4 และ 6 เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ($P < 0.5$) ปริมาณฟีนอลิกในน้ำชาเขียวผสมโพรไบโอติกไม่แตกต่างจากชุดควบคุมตลอดอายุการเก็บรักษา ในขณะที่ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระมีปริมาณเพิ่มขึ้น เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้น ในสัปดาห์ที่ 6 ของการเก็บรักษา พบว่าปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในน้ำชาเขียวที่เติม *L. casei* มีมากกว่าน้ำชาเขียวที่เติม *L. acidophilus* และชุดควบคุม ($P < 0.05$) ดังนั้นการเติม *L. casei* และ *L. acidophilus* ในน้ำชาเขียวสามารถช่วยเพิ่มคุณประโยชน์ต่อสุขภาพของผลิตภัณฑ์ชาเขียวได้

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี โครงการจัดตั้งภาควิชาจุลชีววิทยา กองทุนพัฒนานิสิต คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

Table 1 Antioxidant content (mg equivalent Vit. C or Vit. E/ml) in green tea (control), green tea with *Lactobacillus casei* (TISTR 1463) or *Lactobacillus acidophilus* (TISTR 1336) after storage at 4°C for 6 weeks.

Storage time (Weeks)	Antioxidant (mg equivalent Vit. C/ml)			Antioxidant (mg equivalent Vit. E/ml)		
	Control	<i>L. casei</i>	<i>L. acidophilus</i>	Control	<i>L. casei</i>	<i>L. acidophilus</i>
0	0.04 ± 0.0 ^d	0.06 ± 0.00 ^d	0.05 ± 0.00 ^d	0.04 ± 0.00 ^d	0.05 ± 0.00 ^d	0.05 ± 0.00 ^d
1	0.05 ± 0.05 ^d	0.05 ± 0.05 ^d	0.05 ± 0.05 ^d	0.04 ± 0.00 ^d	0.04 ± 0.00 ^d	0.04 ± 0.00 ^d
2	1.23 ± 0.03 ^c	1.19 ± 0.03 ^c	1.20 ± 0.01 ^c	1.05 ± 0.02 ^c	1.01 ± 0.03 ^c	1.02 ± 0.01 ^c
3	1.08 ± 0.04 ^c	1.20 ± 0.02 ^c	1.06 ± 0.02 ^c	0.92 ± 0.03 ^c	1.02 ± 0.02 ^c	0.91 ± 0.01 ^c
4	1.40 ± 0.09 ^{bc}	1.86 ± 0.10 ^{bc}	1.07 ± 0.07 ^c	1.19 ± 0.07 ^{bc}	1.58 ± 0.21 ^{bc}	0.91 ± 0.06 ^c
5	1.80 ± 0.02 ^b	2.30 ± 0.05 ^b	2.17 ± 0.06 ^b	1.55 ± 0.02 ^b	1.96 ± 0.03 ^b	1.85 ± 0.05 ^b
6	3.52 ± 0.07 ^a	4.34 ± 0.12 ^a	3.42 ± 0.17 ^a	3.01 ± 0.06 ^a	3.37 ± 0.21 ^a	2.91 ± 0.01 ^a

Values are expressed as mean ± SE (n=3). Different upper-case letters in the same column indicate significantly different ($p < 0.05$).

เอกสารอ้างอิง

- Benzie, I.F.F. and Stain, J.J., 1996, The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as Measure of Antioxidant Power: The FRAP Assay, *Analytical Biochemistry*, 239: 70–76.
- Blum, U., 1998, Effects of Microbial Utilization of Phenolic Acids and Their Phenolic Acid Breakdown Products on Allelopathic Interactions, *Journal of Chemical Ecology*, 24: 685-708.
- Jeong, C.H., Ryu, H., Zhang, T., Lee, C.H., Seo, H.G., and Han, S.G., 2018, Green Tea Powder Supplementation Enhances Fermentation and Antioxidant Activity of Set-type Yogurt, *Food Science and Biotechnology*, 27(5): 1419-1427.
- Lejko, D.N., 2014, Effect of Green Tea Supplementation on the Microbiological, Antioxidant, and Sensory Properties of Probiotic Milks, *Dairy Science and Technology*, 94(4): 327-339.
- Lorenzo, J.M. and Munekata, P.E.S., 2016, Phenolic Compounds of Green Tea: Health Benefits and Technological Application in Food, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(8): 709-719.
- Muniandy, P., Shori, A.B., and Baba, A.S., 2016, Influence of Green, White and Black Tea Addition on the Antioxidant Activity of Probiotic Yogurt During Refrigerated Storage, *Food Packaging and Shelf Life*, 8: 1-8.
- Musial, C., Kuban-Jankowska, A. and Gorska-Ponikowska, M., 2020, Beneficial Properties of Green Tea Catechins, *International Journal of Molecular Science*, 21(5): 1744.
- Pinto, M. S., 2013, Tea: A New Perspective on Health Benefits, *Food Research International*, 53(2): 558-567.
- Singleton, V. L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventos, R.M., 1999, Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates by Means of Folin-Ciocalteu Reagent, *Methods in Enzymology*, 299: 152–178.
- Suzuki, Y., Miyoshi, N., and Isemura, A., 2012, Health-promoting Effects of Green Tea, *Proceedings of The Japan Academy, Series B Physical and Biological Sciences*, 88(3): 88-101.
- Wang, H., Provan, G., Helliwell, K., Ransom, W., 2003, The Functional Benefits of Flavonoids: The case of tea, *Phytochemical Functional Foods*, Elsevier Ltd, United Kingdom, p.128-159.