วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 2562 : 37 (1) : 69-77

สภาวะที่เหมาะสมต่อความสามารถต้านอนุมูลอิสระของ *Rhodotorula rubra* MJU18

Optimization Antioxidant Ability of *Rhodotorula rubra* MJU18

ณัฐพร จันทร์ฉาย[1]* และศันศนีย์ บุญเกิด[1]
Nuttaporn Chanchay[1]* and Sunsanee Boonkerd[1]

บทคัดย่อ

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อความสามารถต้านอนุมูลอิสระของเชื้อยีสต์ *Rhodotorula rubra* MJU18โดยวิธี DPPH และสภาวะที่เหมาะสมของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ *R.rubra* MJU18 โดยใช้การออกแบบการทดลองทางสถิติเพื่อประเมินอิทธิพลของสารอาหารที่สำคัญ ซึ่งแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) ได้ถูกนำมาใช้ในการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ (ปริมาณคาร์บอน ปริมาณไนโตรเจน ปริมาณสารส่งเสริมการเจริญเติบโต ความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิ) ในปริมาณที่แตกต่างกัน พบว่า สภาวะการทดลองที่ประกอบด้วยอาหารที่มี กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ปริมาณ 15 กรัมต่อลิตร มีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ปริมาณ 2 กรัมต่อลิตร มีสารสกัดจากยีสต์เป็นสารส่งเสริมการเจริญเติบโตที่ปริมาณ 2 กรัมต่อลิตร มีความเป็นกรด-ด่างที่ 5.5 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลาเลี้ยงเชื้อ 72 ชั่วโมง แสดงผลความสามารถในฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH สูงสุดเท่ากับ 99.22 เปอร์เซ็นต์

คำสำคัญ: สารต้านอนุมูลอิสระ การออกแบบการทดลองทางสถิติ DPPH *Rhodotorula rubra* MJU18

Abstract

Optimization of the antioxidant of *Rhodotorula rubra* MJU18 was determined by using DPPH assay and optimization of media for *R. rubra* MJU18 using statistical experimental was designed to assess the influence of important nutrients. The experimental design Central Composite Design (CCD) was used to study various factors (carbon, nitrogen, growth factor, pH and temperature) in different quantities. The study found that the optimized medium of 15 g/l glucose as carbon source, 2 g/l ammonium sulfate as nitrogen source, 2 g/l yeast extract as growth factor, pH 5.5 and incubation at 37°C for 72 hours provided the best antioxidant activity of 99.22 %.

Keywords: Antioxidant, Mathematical soft ware packages, DPPH, *Rhodotorula rubra* MJU18

[1]สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ อ. ร้องกวาง จ. แพร่ 54140
*Corresponding author, Email: nuttapornchanchay@gmail.com

คำนำ

เนื่องจากปัจจุบันมนุษย์ต้องดำรงชีวิตอยู่กับความเร่งรีบ ภัยจากธรรมชาติ การเกิดจลาจล และปัจจัยอื่น ๆ ก่อให้เกิดความเครียดและการป่วยเป็นโรคความแก่ชรา (Aging) กลุ่มโรคและภาวะทางสมองทั้งหลาย โรคทางตา โรคของปอดและหัวใจ โรคของตับ โรคไต โรคภูมิคุ้มกันร่างกายตนเองทำร้ายตนเอง (Auto-immune disease) โรคมะเร็ง และโรคความดันโลหิตสูง เป็นต้น ซึ่งสาเหตุหนึ่งของการเกิดโรคเหล่านี้ คือ อนุมูลอิสระ ที่จะไปทำปฏิกิริยากับโมเลกุลในร่างกาย ทำให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์ อาจกลายสภาพเป็นเนื้อร้ายในร่างกาย (Punchard and Kelly, 1996)

สารที่มีบทบาท และช่วยยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระในร่างกายที่สำคัญมีชื่อว่า สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ที่สามารถป้องกันหรือชะลอกระบวนการเกิดออกซิเดชันที่เกิดจากอนุมูลอิสระซึ่งสร้างความเสียหาย

ต่อเซลล์ในร่างกายได้ (Songchitsomboon *et al*., 2005) แต่สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในร่างกายของคนเรานั้นไม่เพียงพอต่อการต้านอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกาย จึงต้องได้รับสารต้านอนุมูลอิสระเพิ่มจากแหล่งอื่น เช่น จากอาหารที่รับประทานจำพวก ผักผลไม้ เนื้อสัตว์ นม และไข่ เป็นต้น และปัจจุบันยังมีอาหารเสริมที่สกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ออกจำหน่ายตามท้องตลาด

จากการที่สารต้านอนุมูลอิสระมีความสำคัญอย่างมากจึงนำไปสู่ความคิดที่จะพัฒนากระบวนการเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ *Rhodotorula rubra* MJU18 เป็นเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มของยีสต์ ที่สามารถผลิตสารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มของแคโรทีนอยด์ให้สีส้มแดงที่สูงที่สุด ดังนั้น การทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยง (แหล่งคาร์บอน ระหว่างกลูโคส และซูโครส แหล่งไนโตรเจน ระหว่างแอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมคลอไรด์ และแหล่งสารส่งเสริมการเจริญเติบโต ระหว่างสารสกัดจากยีสต์ และเปปโตน) ที่สามารถ ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดด้วยวิธี DPPH จากนั้นศึกษาสภาวะการเลี้ยงที่ได้จากโปรแกรมคอมพิวเตอร์ เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่สูงที่สุดด้วยวิธี DPPH

วิธีการศึกษา

การเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์

เชื้อ *Rhodotorula rubra* MJU18 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยเลี้ยง *R. rubra* MJU18 ในอาหารสูตรมาตรฐาน และบ่มที่อุณหภูมิห้องในเครื่องเขย่าให้อากาศด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

การศึกษาแหล่งอาหารที่เหมาะสมต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของเชื้อยีสต์ *R. rubra* MJU18 ด้วยวิธี DPPH

การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม เปรียบเทียบแหล่งคาร์บอน 2 แหล่ง คือ กลูโคส และซูโครส โดยแต่ละแหล่งใช้ปริมาณ 10 กรัมต่อลิตรในอาหารสูตรมาตรฐาน (กลูโคส10 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 1 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 1 กรัมต่อลิตร และสารสกัดจากยีสต์ 1 กรัมต่อลิตร) บ่มที่อุณหภูมิห้องในเครื่องเขย่าให้อากาศด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และทำการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วย วิธี DPPH เพื่อเลือกแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม เปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจน 2 แหล่ง คือแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) และแอมโมเนียมคลอไรด์ ($(NH_4)_2Cl$) โดยแต่ละแหล่งใช้ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตรในอาหารสูตรมาตรฐานที่มีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากผลการทดลองที่ 2.1 บ่มที่อุณหภูมิห้อง ในเครื่องเขย่าให้อากาศด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นล้างเซลล์ 2 ครั้ง ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และทำการวัดความ

สามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH เพื่อเลือกแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

การศึกษาสารส่งเสริมการเจริญเติบโตที่เหมาะสม เปรียบเทียบสารที่ส่งเสริมการเติบโต 2 แหล่ง คือ เปปโตน และสารสกัดจากยีสต์ โดยแต่ละแหล่งใช้ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 2.1 และการทดลองที่ 2.2 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในเครื่องเขย่าให้อากาศด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นทำการล้างเซลล์ 2 ครั้ง ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และทำการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH เพื่อเลือกแหล่งสารอาหารที่ส่งเสริมการเติบโตที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการทดลอง จากนั้นนำผลของแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน และสารส่งเสริมการเจริญเติบโตมาทำการทดลองด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางคณิตศาสตร์ต่อไป

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยแผนการทดลองแบบ CCD

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระของยีสต์ *R.rubra* MJU18 โดยศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่เหมาะสมต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยขั้นตอนนี้ทำการทดลองโดยการออกแบบแผนการทดลองด้วยแผนการทดลองแบบ CCD เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *R.rubra* MJU18 ที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยศึกษาปัจจัยทั้ง 5 ได้แก่ ปริมาณแหล่งคาร์บอน ปริมาณแหล่งไนโตรเจน ปริมาณแหล่งสารส่งเสริมการเจริญเติบโต ความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิ (Table 1) จากการออกแบบการทดลอง (Table 2) ศึกษาทั้งหมด 27 ชุดการทดลอง (ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ) บ่มในเครื่องเขย่าให้อากาศด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นทำการล้างเซลล์ที่ได้ด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง และทำการวัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH แสดงผลเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสารอนุมูลอิสระและนำไปทดสอบการยืนยันผลทางสถิติ

Table 1 Factors of food sources, pH and temperature.

Factor	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
C-source (g/l); C	3	10	15	20	27
N-source (g/l); N	0.8	1.5	2	2.5	3.2
Growth factor (g/l); GF	0.8	1.5	2	2.5	3.2
pH	4.3	5.0	5.5	6.0	6.7
Temperature; T	23	27	30	33	37

Table 2 Experimental factors of 27 experiments were obtained from CCD.

Runs	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
C	10	10	10	10	10	10	10	10	20	20	20	20	20	20	20	20	3	27	15	15	15	15	15	15	15	15	15
N	1.5	1.5	1.5	1.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.5	1.5	1.5	1.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2	2	0.8	3.2	2	2	2	2	2	2	2
GF	1.5	1.5	2.5	2.5	1.5	1.5	2.5	2.5	1.5	1.5	2.5	2.5	1.5	1.5	2.5	2.5	2	2	2	2	0.8	3.2	2	2	2	2	2
pH	5.0	6.0	5.0	6.0	5.0	6.0	5.0	6.0	5.0	6.0	5.0	6.0	5.0	6.0	5.0	6.0	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	4.3	6.7	5.5	5.5	5.5
T (°C)	33	27	27	33	27	33	33	27	27	33	33	27	33	27	27	33	30	30	30	30	30	30	30	30	23	37	30

Note : Runs stands for experimental set, C stands for carbon source, N stands for nitrogen source, GF stands for growth factor source and T means temperature.

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การศึกษาแหล่งอาหารที่เหมาะสม

จากการศึกษาแหล่งของสารอาหารที่เหมาะสม (แหล่งคาร์บอน ระหว่างกลูโคสและซูโครส แหล่งไนโตรเจน ระหว่างแอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมคลอไรด์ และแหล่งสารส่งเสริมการเจริญเติบโต ระหว่างสารสกัดจากยีสต์ และเปปโตน) ผลที่ได้เป็นดังแสดงใน Table 3

Table 3 The study on optimal nutrient sources inhibition of free radicals by DPPH method.

Nutritional resources	C-source		N-source		Growth factor source	
	Glucose	Sucrose	$((NH_4)_2SO_4)$	$((NH_4)_2Cl)$	Yeast extract	Peptone
% Inhibition Average	0.778a	0.352b	1.168a	0.722b	1.460a	1.020b

Note Lowercase letters in the results indicate statistical differences.

ผลของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของ *R. rubra* MJU18

จากการเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอน 2 แหล่ง คือ กลูโคส และซูโครส โดยแต่ละแหล่งใช้ปริมาณ 10 กรัมต่อลิตร ในอาหารสูตรมาตรฐาน บ่มที่อุณหภูมิห้อง ในเครื่องเขย่าให้อากาศด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ผลการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH โดยใช้เครื่องดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 514 นาโนเมตร (Foti *et al.*, 2004) และแสดงผลเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสารอนุมูลอิสระด้วยสูตร ดังนี้

$$\%\text{Inhibition} = \frac{(\text{Initial absorbance} - \text{Final absorbance})}{\text{Initial absorbance}} \times 100$$

จากผลความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของเชื้อยีสต์ *R. rubra* MJU18 ด้วยวิธี DPPH พบว่ากลูโคสให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระเฉลี่ยที่ 0.778 เปอร์เซ็นต์ ส่วนซูโครสให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสารอนุมูลอิสระเฉลี่ยที่ 0.352 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งให้ผลแตกต่างจากของ Wang *et al.* (2010) ทดสอบความสามารถต้านอนุมูลอิสระของสุราบริสุทธิ์และกึ่งบริสุทธิ์ ที่ได้จากการหมักน้ำหมึกจากปากกาที่เป็นของเสียชีวภาพโดย *Serratia ureilytica* TKU013 ซึ่งใช้ไคติน และไคโตซาน เป็นแหล่งคาร์บอน มีความสามารถต้านอนุมูลอิสระสูงสุดเท่ากับ 82 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงเลือกกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อศึกษาแหล่งไนโตรเจนต่อไป

ผลของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของ *R. rubra* MJU18

จากการเปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจน 2 แหล่ง คือ แอมโมเนียมซัลเฟต $((NH_4)_2SO_4)$ และ แอมโมเนียมคลอไรด์ $((NH_4)_2Cl)$ โดยแต่ละแหล่งใช้ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร ในอาหารสูตรมาตรฐานร่วมโดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิห้องในเครื่องเขย่าให้อากาศด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วทำการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH โดยใช้เครื่องดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 514 นาโนเมตร และแสดงผลเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระได้ผลความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของเชื้อยีสต์*R. rubra* MJU18 ด้วยวิธี DPPH พบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระเฉลี่ยที่ 1.168 เปอร์เซ็นต์ ส่วนแอมโมเนียมคลอไรด์ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระเฉลี่ยที่ 0.722 เปอร์เซ็นต์ โดยผลการยับยั้งอนุมูลอิสระแตกต่างกับของ Daljit and Priyanka (2011) ที่ทำการศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระจาก *Aspergillus fumigatus* โดยใช้โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$) เป็นแหล่งไนโตรเจน เมื่อทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่า *A. fumigatus*

มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดที่ 89.8 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น จึงเลือกแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อศึกษาแหล่งสารส่งเสริมการเจริญเติบโตต่อไป

ผลของแหล่งของสารส่งเสริมการเติบโตที่เหมาะสมต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของ *R. rubra* MJU18

จากการเปรียบเทียบสารที่ส่งเสริมการเติบโต 2 แหล่ง คือ เปปโตน และสารสกัดจากยีสต์ โดยแต่ละแหล่งใช้ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร ในอาหารสูตรมาตรฐานร่วมกับกลูโคสและแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิห้องในเครื่องเขย่าให้อากาศด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วทำการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH โดยใช้เครื่องดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 514 นาโนเมตร และแสดงผลเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระได้ผลความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของเชื้อยีสต์ *R.rubra* MJU18 ด้วยวิธี DPPH พบว่าสารสกัดจากยีสต์ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสารอนุมูลอิสระเฉลี่ยที่1.463 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเปปโตนให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสารอนุมูลอิสระเฉลี่ยที่ 1.018 เปอร์เซ็นต์ โดยผลการยับยั้งอนุมูลอิสระ ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับ Anna and Barbara (2010) ที่ศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระของแคโรทีนอยด์จาก Phaffia rhodozyma ที่เลี้ยงในอาหาร Yeast malt (YM) โดยใช้ Yeast extract และ Malt extract เป็นแหล่งสารส่งเสริมการเจริญเติบโต พบว่า *P. rhodozyma* ที่เลี้ยงด้วย Yeast extract มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดที่ 48.89 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น จึงเลือกสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งสารส่งเสริมการเจริญเติบโต

ผลการออกแบบการทดลองแบบ CCD ของปริมาณอาหารที่เหมาะสมต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของยีสต์ *R. rubra* MJU18

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของยีสต์ *R. rubra* MJU18 โดยศึกษาปัจจัยต่าง ๆ โดยขั้นตอนนี้ทำการทดลองโดยการออกแบบแผนการทดลองแบบ CCD เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของ *R. rubra* MJU18 โดยศึกษาปัจจัยทั้ง 5 ได้แก่ ปริมาณคาร์บอน ปริมาณไนโตรเจน ปริมาณสารส่งเสริมการเจริญเติบโต (Growth factor) pH และอุณหภูมิ ซึ่งการศึกษาทั้งหมดจะทำการทดลอง 27 ชุดการทดลอง (ชุดทดลองละ 3 ซ้ำ) บ่มในเครื่องเขย่าให้อากาศด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำการวัดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH แสดงผลเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสารอนุมูลอิสระ และนำไปทดสอบการยืนยันผลความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทางสถิติ โดยวิธีของ Duncan (DMRT) ได้ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของยีสต์ *R.rubra* MJU18 ดัง Table 4 และ Figure 1 ดังนี้

การศึกษาปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระเปรียบเทียบปริมาณโดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน 5 ระดับ คือ 3, 10, 15, 20 และ 27 กรัมต่อลิตร แล้วทำการวัดความสามารถต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่าชุดการทดลองที่ 26 ซึ่งใช้ปริมาณกลูโคส 15 กรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระสูงที่สุด คือ 99.222 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ ชุดการทดลองที่ 16 ซึ่งใช้ปริมาณกลูโคส 20 กรัมต่อลิตรให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ 99.278 เปอร์เซ็นต์ และลำดับที่สาม คือ ชุดการทดลองที่ 17 ซึ่งใช้ปริมาณกลูโคส 3 กรัมต่อลิตรให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง อนุมูลอิสระ 33.555 เปอร์เซ็นต์ซึ่งเปอร์เซ็นต์การยับยั้งในชุดการทดลองที่ 26 และ16 ไม่มีความแตกต่างทางนัยสำคัญแต่อย่างใด แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับชุดการทดลองที่ 17 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากเปอร์เซ็นต์การยับยั้งในชุดการทดลองที่ 26 และ16 ไม่มีความแตกต่างทางนัยสำคัญแต่อย่างใด ทำให้เลือกชุดการทดลองที่ 26 ซึ่งใช้ปริมาณกลูโคสน้อย ซึ่งแตกต่างจากผลของ Daljit and Priyanka (2011) ที่ศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระจาก *A. fumigatus* โดยใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *A. fumigatus* มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดที่ 89.8 เปอร์เซ็นต์ และพบว่า กลูโคสให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ดีกว่าการใช้ซูโครส และยังแตกต่างจากของ Wang *et al.* (2010) ที่ทดสอบความสามารถต้านอนุมูลอิสระของสุราบริสุทธิ์และกึ่งบริสุทธิ์จากการหมักน้ำหมึกจากปากกาที่เป็นของเสียชีวภาพโดย *S. ureilytica* TKU013 โดยใช้ไคตินและไคโตซาน เป็นแหล่งคาร์บอน

มีความสามารถต้านอนุมูลอิสระสูงสุดเท่ากับ 82 เปอร์เซ็นต์

Table 4 Results of various factors (carbon content, nitrogen content, growth promoter content, pH and temperature) were measured by DPPH method.

R.	C	N	GF	pH	T(°C)	Blank	Average absorption ; λ514	% Inhibition average
1	10	1.5	1.5	5	33	0.6	0.5930	1.1667c
2	10	1.5	1.5	6	27	0.6	0.5970	0.4447c
3	10	1.5	2.5	5	27	0.6	0.5970	0.5000c
4	10	1.5	2.5	6	33	0.6	0.5980	0.3890c
5	10	2.5	1.5	5	27	0.6	0.5930	1.1667c
6	10	2.5	1.5	6	33	0.6	0.5960	0.6667c
7	10	2.5	2.5	5	33	0.6	0.5950	0.8890c
8	10	2.5	2.5	6	27	0.6	0.5900	1.6667c
9	20	1.5	1.5	5	27	0.6	0.5850	2.4443c
10	20	1.5	1.5	6	33	0.6	0.5920	1.3333c
11	20	1.5	2.5	5	33	0.6	0.5920	0.8890c
12	20	1.5	2.5	6	27	0.6	0.5890	1.7777c
13	20	2.5	1.5	5	33	0.6	0.5940	1.0553c
14	20	2.5	1.5	6	27	0.6	0.5870	2.0557c
15	20	2.5	2.5	5	27	0.6	0.5890	1.8333c
16	20	2.5	2.5	6	33	0.6	0.6040	99.2777a
17	3	2	2	5.5	30	0.6	0.5990	33.5553b
18	27	2	2	5.5	30	0.6	0.5910	1.4443c
19	15	0.8	2	5.5	30	0.6	0.5950	0.7777c
20	15	3.2	2	5.5	30	0.6	0.5970	0.4443c
21	15	2	0.8	5.5	30	0.6	0.6000	33.3333b
22	15	2	3.2	5.5	30	0.6	0.5960	0.6667c
23	15	2	2	4.3	30	0.6	0.5890	1.7777c
24	15	2	2	6.7	30	0.6	0.5940	1.0003c
25	15	2	2	5.5	23	0.6	0.5920	1.3890c
26	15	2	2	5.5	37	0.6	0.6050	99.2223a
27	15	2	2	5.5	30	0.6	0.5950	0.8333c

Note: Runs stands for experimental set, C stands for carbon source, N stands for nitrogen source, GF stands for growth factor source and T means temperature. Lowercase letters in the results indicate statistical differences ($p \leq 0.05$).

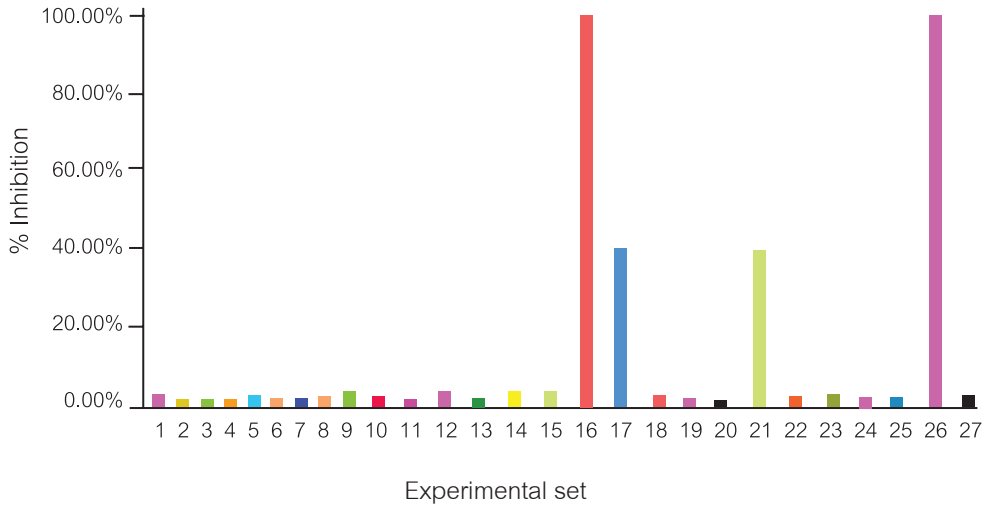

Figure 1 DPPH percentage depreciation of various factor inputs.

การศึกษาปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระเปรียบเทียบปริมาณโดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) เป็นแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน 5 ระดับ คือ 0.8, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.2 กรัมต่อลิตร แล้วทำการวัดความสามารถต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และแสดงผลเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ พบว่าชุดการทดลองที่ 26 ซึ่งใช้ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระสูงที่สุด คือ 99.222 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ชุดการทดลองที่ 16 ซึ่งใช้ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต 2.5 กรัมต่อลิตรให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ 99.278 เปอร์เซ็นต์ และลำดับที่สาม คือ ชุดการทดลองที่ 17 ซึ่งใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ 33.555 เปอร์เซ็นต์ซึ่งเปอร์เซ็นต์การยับยั้งในชุดการทดลองที่ 26 และ 16 ไม่มีความแตกต่างทางนัยสำคัญแต่อย่างใด แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับชุดการทดลองที่ 17 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยผลการยับยั้งอนุมูลอิสระของ *R. rubra* MJU18 และเนื่องจากเปอร์เซ็นต์การยับยั้งในชุดการทดลองที่ 26 และ 16 ไม่มีความแตกต่างทางนัยสำคัญแต่อย่างใด ทำให้ชุดการทดลองที่ 26 ซึ่งใช้ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต น้อยกว่าชุดการทดลองที่ 16 ซึ่งสอดคล้องกับของ Chanchay and Suwanpong (2008) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตรงควัตถุแคโรทีนอยด์และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของยีสต์ (*R. rubra*) โดยใช้กากมะเขือเทศเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจากการวิเคราะห์คุณสมบัติปริมาณไนโตรเจน (แอมโมเนียมซัลฟต) มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดเท่ากับ 98.7614 เปอร์เซ็นต์

การศึกษาปริมาณสารส่งเสริมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้สารสกัดจากยีสต์ในปริมาณที่แตกต่างกัน 5 ระดับ คือ 0.8, 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.2 กรัมต่อลิตร แล้วทำการวัดความสามารถต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และแสดงผลเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระพบว่าชุดการทดลองที่ 26 ซึ่งใช้ปริมาณสารสกัดจากยีสต์ 2 กรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระสูงที่สุด คือ 99.222 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ชุดการทดลองที่ 16 ซึ่งใช้ปริมาณสารสกัดจากยีสต์ 2.5 กรัมต่อลิตรให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ 99.278 เปอร์เซ็นต์และลำดับที่สาม คือ ชุดการทดลองที่ 17 ซึ่งใช้ปริมาณสารสกัดจากยีสต์ 2 กรัมต่อลิตร ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ 33.555 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเปอร์เซ็นต์การยับยั้งในชุดการทดลองที่ 26 และ 16 ไม่มีความแตกต่างทางนัยสำคัญแต่อย่างใด แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับชุดการทดลองที่ 17 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยผลการยับยั้งอนุมูลอิสระของ *R. rubra* MJU18 และเนื่องจากเปอร์เซ็นต์การยับยั้งในชุดการทดลองที่ 26 และ16

ไม่มีความแตกต่างทางนัยสำคัญแต่อย่างใด ทำให้เลือกชุดการทดลองที่ 26 ซึ่งใช้ปริมาณสารสกัดจากยีสต์น้อยกว่าชุดการทดลองที่ 16 ซึ่งแตกต่างจากของ Anna and Barbara (2010) ศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระของแคโรทีนอยด์สารสกัดจาก *P. rhodozyma* เลี้ยงในอาหาร Yeast malt (YM) เป็นแหล่งสารส่งเสริมการเจริญเติบโต พบว่า *P. rhodozyma* ที่เลี้ยงใน Yeast extract มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดที่ 48.89 เปอร์เซ็นต์

การศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อความสามารถต้านอนุมูลอิสระเปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่างที่แตกต่างกัน 5 ระดับ คือ 4.3, 5.0, 5.5, 6.0 และ 6.7 แล้วทำการวัดความสามารถอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และแสดงผลเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระพบว่าชุดการทดลองที่ 26 ซึ่งใช้ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 5.5 ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระสูงที่สุด คือ 99.222 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ ชุดการทดลองที่ 16 ซึ่งใช้ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.0 ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ 99.278 เปอร์เซ็นต์ และลำดับที่สาม คือ ชุดการทดลองที่ 17 ซึ่งใช้ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 5.5 ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ 33.555 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเปอร์เซ็นต์การยับยั้งในชุดการทดลองที่ 26 และ16 ไม่มีความแตกต่างทางนัยสำคัญแต่อย่างใด แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับชุดการทดลองที่ 17 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยผลการยับยั้งอนุมูลอิสระของ *R. rubra* MJU18 และเนื่องจากเปอร์เซ็นต์การยับยั้งในชุดการทดลองที่ 26 และ16 ไม่มีความแตกต่างทางนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) แต่อย่างใด ทำให้เลือกชุดการทดลองที่ 26 ซึ่งใช้ค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำกว่าชุดการทดลองที่ 16 ซึ่งแตกต่างจากของ Akinniyi and Ifeoma (2010) ที่ทำการศึกษาสารต้านอนุมูลอิสระจากหางนมจากนมหมักด้วย Lactobacillus ที่แยกได้จากอาหารหมักดองไนจีเรีย หมักที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 4 พบว่า *L. brevis* มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH มากที่สุดเท่ากับ 33.7เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระจากค่าความเป็นกรด-ด่างที่ใช้ในการผลิตแล้วพบว่าที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5.5 ให้ผลการยับยั้งอนุมูลอิสระสูงกว่า

การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อความสามารถต้านอนุมูลอิสระเปรียบเทียบอุณหภูมิที่แตกต่างกัน 5 ระดับ คือ 23, 27, 30, 33 และ37 องศาเซลเซียส แล้วทำการวัดความสามารถต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และแสดงผลเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสารต้านอนุมูลอิสระพบว่าชุดการทดลองที่ 26 ซึ่งใช้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระสูงที่สุด คือ 99.222 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ ชุดการทดลองที่ 16 ซึ่งใช้อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส ให้เปอร์เซ็นต์การยับยังอนุมูลอิสระ 99.278 เปอร์เซ็นต์ และลำดับที่สาม คือ ชุดการทดลองที่17 ซึ่งใช้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ 33.555 เปอร์เซ็นต์ซึ่งเปอร์เซ็นต์การยับยั้งในชุดการทดลองที่ 26 และ16 ไม่มีความแตกต่างทางนัยสำคัญแต่อย่างใด แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับชุดการทดลองที่ 17 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์โดยผลการยับยั้งอนุมูลอิสระของ *R.rubra* MJU18 และเนื่องจากเปอร์เซ็นต์การยับยั้งในชุดการทดลองที่ 26 และ16 ไม่มีความแตกต่างทางนัยสำคัญแต่อย่างใด ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่อุณหภูมิ 33 และ 37 องศาเซลเซียส ทุกชุดการทดลองแล้วพบว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงกว่าทำให้เลือกชุดการทดลองที่ 26 ซึ่งมีอุณหภูมิสูงกว่าชุดการทดลองที่ 16 ซึ่งให้ผลแตกต่างกับ Kapila and Sinha (2006) ที่ทำการศึกษาผลต้านอนุมูลอิสระ ของ *L. casei* ทำการเลี้ยงในหางนมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อนำไปทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี MS-TBA assay พบว่า *L.casei* 19 มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดที่ 76.82 เปอร์เซ็นต์

สรุปผลการศึกษา

ผลการทดลองสภาวะที่เหมาะสมต่อความสามารถต้านอนุมูลอิสระของยีสต์ R. rubra MJU18 ที่ระดับปัจจัยต่าง ๆ พบว่าสภาวะที่ประกอบไปด้วยกลูโคส 15 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร สารสกัดจากยีสต์ 2 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5.5 และที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระสูงที่สุดที่ 99.22 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากเมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารอาหารที่ใช้ในการผลิตกับเปอร์เซ็นต์

การยับยั้งอนุมูลอิสระของชุดการทดลองที่ 26 และ16 แล้วเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระจากทั้ง 2 ชุดการทดลองไม่แตกต่างกันทางสถิติ และชุดการทดลองที่ 26 ใช้ปริมาณสารอาหารน้อยกว่าเมื่อนำผลที่ได้ไปทำการเปรียบเทียบกับชุดการทดลองอื่น ๆ พบว่าชนิดของสารอาหารและปริมาณที่ใช้น้อยกว่า รวมไปถึงสภาวะที่เหมาะสมต่อยีสต์ *R.rubra* MJU18ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระสูงกว่ามาก ซึ่งเป็นผลดีต่อการนำไปใช้ในกระบวนการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระในระดับโรงงาน เนื่องจากเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระ เพราะการผลิตสารอนุมูลอิสระจากเชื้อยีสต์ *R.rubra* MJU18 ทำให้ได้สารต้านอนุมูลอิสระที่มากกว่าการสกัดจากพืชหรือการหมักจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น และช่วยลดต้นทุนเรื่องค่าใช้จ่ายในการจัดซื้ออาหารสำหรับเลี้ยงยีสต์ *R.rubra* MJU18

เอกสารอ้างอิง

Akinniyi, O. and K. Ifeoma. 2010. Antioxidant Activity of Whey from Milk Fermented with Lactobacillus sp. Isolated from Nigerian Fermented Foods. Food technol Biotechnal. 48(4), 505-511.

Anna, G.M. and S. Barbara. 2010.The Antioxidant Potential of Carotenoid Extract from Phaffia rhodozyma. Acta Scien Pol., Technol. Aliment. 9(2), 171-188.

Chanchay, N. and S. Suwanpong. 2008. Optimization of production carotenoids pigment and the ability of antioxidants of yeast (Rhodotorula rubra) by using waste as a tomato broth. Biotechnology Department, Maejo University Phrae Campus. 437-444.

Daljit, S.A. and C. Priyanka. 2011. Antioxidant Activity of Aspergillus fumigatus. International Scholarly Research Network. Volume 2011 (2011), Article ID 619395, 11 pages.

Foti, M.C., C.Daquino, and C. Geraci. 2004. Electron-transfer reaction of cinnamic acid and their methyl esters with the DPPH radicl in alcoholic solutions. J.Org.Chem., 69, 2309-2314

Kapila, S.V. and P.R. Sinha. 2006. Antioxidative and hypocholestero lemic effect of Lactobacillus casei. Indian J Med Sci. 60(9), 361-370.

Punchard, N.A. and F.J. Kelly. 1996. Free radicals. A Practical Approach. Oxford Univ Press.

Songchitsomboon, S., P. Ubdoonlakasim, and S. Komin. 2005. How is the antioxidants are essential to the body. Moo Chao Baan Magazine. 27(316).

Wang, S.L., K.C. Liu, T.W. Liang, Y.H Kuo and C.Y. Wang. 2010. In vitro antioxidant activity of liquor and semi-purified fractions from fermented squid pen biowaste by Serratia ureilytica TKU013. Food Chemistry. 119(4), 1380-1385.

วันรับบทความ (Received date) 7 มิ.ย. 2560
วันแก้ไขบทความ (Revised date) 30 มิ.ย. 2561
วันตอบรับบทความ(Accepted date) 5 ก.ย. 2561