



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การผลิตแอสตาแซนทินต้นทุนต่ำ
และการพัฒนาการนำส่งสารสู่เซลล์
(DBG5180019)

โดย ร.ศ. ดร. กัลยาณี จิรศรีพงศ์พันธ์ และคณะ

สิงหาคม 2554

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การผลิตแอสตาแซนทินต้นทุนต่ำ
และการพัฒนาการนำส่งสารสู่เซลล์

คณะผู้วิจัย

1. ร.ศ. ดร. กัลยาณี จิรศรีพงศ์พันธ์
2. ดร. นวลอนงค์ จิระกาญจนากิจ
3. ดร. วณิดา วัฒนการุณ

สังกัด

มหาวิทยาลัยศิลปากร
มหาวิทยาลัยมหิดล
มหาวิทยาลัยศิลปากร

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
สารบัญ	I
สารบัญรูป	III
สารบัญตาราง	V
กิตติกรรมประกาศ	VI
บทคัดย่อภาษาไทย	VI
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	IX
แบบสรุปโครงการวิจัย (Executive Summary)	XI
ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
วัตถุประสงค์	2
ระเบียบวิธีวิจัย	2
การดำเนินงานวิจัย	3
ส่วนที่ 1 การลดต้นทุนการผลิตแอสตาแซนทิน	3
1.1 การเพิ่มผลผลิตโดยการกลายพันธุ์ยีสต์	4
1.1.1 การกลายพันธุ์ยีสต์ด้วย Ethyl-methanesulfonate (EMS)	4
1.1.2 ความสามารถในการเจริญของยีสต์และการผลิตแคโรทีนอยด์	6
1.1.3 การคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์กลายพันธุ์ด้วย β -ionone	9
1.1.4 การคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์กลายพันธุ์ที่สามารถผลิตแอสตาแซนทินได้คงที่	10
1.1.5 ปริมาณแอสตาแซนทินที่ผลิตได้จากยีสต์กลายพันธุ์	14
1.2 การลดต้นทุนการผลิตโดยใช้วัสดุราคาถูกจากการเกษตรเป็นอาหารเลี้ยงยีสต์	14
1.2.1 รูปแบบการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์ดั้งเดิมและยีสต์กลายพันธุ์	14
1.2.2 ความเป็นกรดค่าที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์	15
1.2.3 ชนิดของสารอาหารจากวัสดุทางการเกษตรกับการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์	16
1.2.4 แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์	17
1.2.5 สัดส่วนของคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์	17
ส่วนที่ 2 การตรวจสอบคุณสมบัติต่างๆของแอสตาแซนทินจากยีสต์	17
2.1 การศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสมและการตรวจสอบความเป็นพิษของตัวทำละลาย	17
2.2 การศึกษาความเป็นพิษของสารกระตุ้น <i>tert-butyl hydroperoxide</i>	19
2.3 การทดสอบความเป็นพิษของแอสตาแซนทินที่สกัดจากยีสต์ และผลการยับยั้งเซลล์มะเร็ง	19

2.3.1	การศึกษาผลของแอสตาแซนทินต่อความมีชีวิตของเซลล์	19
2.3.2	การศึกษาความสามารถยับยั้งการเจริญเป็นโคโลนีของเซลล์	20
2.4	ความสามารถต้านออกซิเดชันที่เกิดจาก <i>tert</i> -butyl hydroperoxide ของแอสตาแซนทินที่สกัดจากยีสต์	21
2.4.1	ตรวจสอบโดยการวัดความมีชีวิตของเซลล์ (cell viability assay)	21
2.4.2	ตรวจสอบด้วยวิธี Thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) assay	23
2.5	การทดสอบคุณสมบัติ antioxidant activity โดย DPPH assay (cell free system)	26
2.5.1	การศึกษาเพื่อหาตัวทำลายที่เหมาะสมในการวิเคราะห์	26
2.5.2	ความสามารถต้านอนุมูลอิสระของ Astaxanthin ด้วยวิธี DPPH assay	26
ส่วนที่ 3	การปรับปรุงการนำส่งแอสตาแซนทินสู่เซลล์และประเมินประสิทธิภาพการนำส่ง	27
3.1	ความเป็นพิษของพหุนำส่ง	27
3.2	ประสิทธิภาพการนำส่งของพหุนำส่งในเซลล์ไลน์	28
3.3	ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของแอสตาแซนทิน	30
3.4	แบบจำลองของระบบนำส่งแอสตาแซนทิน	32
3.5	การประยุกต์ใช้แอสตาแซนทินกับระบบนำส่งในการบรรเทาภาวะเครียดออกซิเดชันจากการฉายรังสี	32
สรุป		38
Out put ที่ได้จากโครงการ		40
	ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ	40
	ผลงานวิจัยที่นำเสนอในที่ประชุมวิชาการระดับนานาชาติ	40
เอกสารอ้างอิง		41
ภาคผนวก		43

สารบัญรูป

รูปที่ 1 สัดส่วนการรอดชีวิตและปริมาณเซลล์มีชีวิตของเชื้อ GM807 หลังการบ่มกับ EMS	4
รูปที่ 2 สัดส่วนการรอดชีวิตของเซลล์ยีสต์สายพันธุ์ GM807 และสายพันธุ์กลายพันธุ์ หลังการบ่มกับ EMS ที่ความเข้มข้นต่างๆ	5
รูปที่ 3 สัดส่วนการรอดชีวิตของเซลล์ยีสต์สายพันธุ์ N78, FN99 และสายพันธุ์กลายพันธุ์ หลังการบ่มกับ EMS ที่ความเข้มข้นต่างๆ	5
รูปที่ 4 ความสามารถเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์จากยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิม GM807 และยีสต์ที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วย EMS	6
รูปที่ 5 ความสามารถเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์จากยีสต์ดั้งเดิมและยีสต์ ที่ผ่านการกลายพันธุ์ซ้ำด้วย EMS ที่ 5 % (v/v)	7
รูปที่ 6 ความสามารถเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์ดั้งเดิมและยีสต์ ที่ผ่านการกลายพันธุ์ซ้ำด้วย EMS ที่ 8 % (v/v)	8
รูปที่ 7 ความสามารถเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์ N78 และ FN99 และสายพันธุ์ที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วย EMS ที่ 2 % (v/v)	8
รูปที่ 8 ความสามารถเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์จากยีสต์ดั้งเดิม NEF4, FEF3 และสายพันธุ์ที่ผ่านการกลายพันธุ์ซ้ำด้วย EMS ที่ 5 % (v/v)	9
รูปที่ 9 ความสามารถเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์จากยีสต์ดั้งเดิม GM807 และสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่คัดเลือกบน β -ionone	10
รูปที่ 10 การเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์จากยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิม GM807 และสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่รุ่นต่างๆ ของการถ่ายเลี้ยง	11
รูปที่ 11 ความสามารถเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์จากยีสต์สายพันธุ์กลายพันธุ์ (GES 4, 6, 8, 11) ที่รุ่นต่างๆ ของการถ่ายเลี้ยง	11
รูปที่ 12 ความสามารถเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์จากยีสต์สายพันธุ์กลายพันธุ์ (GET 7, 10, GETH 2) ที่รุ่นต่างๆของการถ่ายเลี้ยง	12
รูปที่ 13 ความสามารถเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์จากยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิม N78 และ NEF4 ที่รุ่นต่างๆ ของการถ่ายเลี้ยง	13
รูปที่ 14 ความสามารถเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์จากยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิม FN99 และสายพันธุ์กลายพันธุ์ FEF3 และ FEF4 ที่รุ่นต่างๆของการถ่ายเลี้ยง	13
รูปที่ 15 การเปลี่ยนแปลงของ reducing sugar และ Total sugar	14
รูปที่ 16 การเปลี่ยนแปลงของ pH และ Brix	15
รูปที่ 17 การเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ต่อหน้าหนักยีสต์	15

รูปที่ 18 เปรียบเทียบความมีชีวิตของเซลล์ที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ (v/v) ของตัวทำละลาย Dimethyl sulfoxide และ Tetrahydrofuran ในเซลล์ไลน์ Vero, Hela และ HepG2	18
รูปที่ 19 เปรียบเทียบความมีชีวิตของเซลล์ที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ ของตัวกระตุ้น t-BHP ในเซลล์ไลน์ vero, Hela และ HepG2	19
รูปที่ 20 ผลของแอสตาแซนทินที่สกัดได้จากยีสต์ต่อความมีชีวิตของเซลล์ Vero, Hela และ HepG2	20
รูปที่ 21 ความสามารถต้านออกซิเดชันที่เกิดจาก <i>tert</i> -butyl hydroperoxide ของแอสตาแซนทินที่สกัดได้จากยีสต์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในเซลล์ไลน์ Vero โดยการวัดความมีชีวิตของเซลล์	21
รูปที่ 22 ความสามารถต้านออกซิเดชัน ที่เกิดจาก <i>tert</i> -butyl hydroperoxide ของแอสตาแซนทินที่สกัดได้จากยีสต์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในเซลล์ไลน์ Hela โดยการวัดความมีชีวิตของเซลล์	22
รูปที่ 23 ความสามารถต้านออกซิเดชัน ที่เกิดจาก <i>tert</i> -butyl hydroperoxide ของ β -carotene ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในเซลล์ไลน์ Vero โดยการวัดความมีชีวิตของเซลล์	22
รูปที่ 24 ความสามารถต้านออกซิเดชัน ที่เกิดจาก <i>tert</i> -butyl hydroperoxide ของ β -carotene ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในเซลล์ไลน์ Hela โดยการวัดความมีชีวิตของเซลล์	23
รูปที่ 25 กราฟมาตรฐานของสารละลาย MDA (nmol/ml) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 532 nm	23
รูปที่ 26 ระดับของ MDA (nmol/mg cell protein) จากเซลล์ Vero ต่อภาวะเครียดออกซิเดชันที่เป็นผลจากตัวกระตุ้น t-BHP ที่ 300, 600, 900 และ 1200 μ M	24
รูปที่ 27 ความสามารถต้านภาวะเครียดออกซิเดชันจาก t-BHP ของแอสตาแซนทินในเซลล์ไลน์ Vero ในระยะเวลา 2 ชั่วโมง	25
รูปที่ 28 ความสามารถต้านภาวะเครียดออกซิเดชันจาก t-BHP ของแอสตาแซนทินในเซลล์ไลน์ Vero หลังจากเวลา 24 ชั่วโมง	25
รูปที่ 29 สัดส่วนของความมีชีวิตของเซลล์หลังบ่มกับพาหะนำส่ง Tween 80, M β -CD, Liposome และ Glycerol ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง	28
รูปที่ 30 ปริมาณแอสตาแซนทินในเซลล์ในสภาวะที่มีและที่ปราศจากพาหะนำส่งในระยะเวลา 24 ชั่วโมง	29
รูปที่ 31. ความเสถียรของแอสตาแซนทินความเข้มข้น 10 μ M ในสภาวะที่มีและไม่มีพาหะนำส่ง ในช่วงเวลา 0–120 ชั่วโมง	31
รูปที่ 32 ความสามารถในการบรรเทาภาวะเครียดออกซิเดชันของแอสตาแซนทินที่มีพาหะนำส่ง liposome ต่อเซลล์ HepG2 จากการฉายรังสียูวีเป็นเวลา 120 นาที	34
รูปที่ 33 ค่าการทำงานของเอนไซม์ catalase ในการกำจัด H ₂ O ₂ แปรผันปริมาตรของส่วนที่สกัดได้จากเซลล์ที่ระยะเวลาของปฏิกิริยา 10 นาที	35
รูปที่ 34 ค่าการทำงานของเอนไซม์ catalase เมื่อบ่มเซลล์กับแอสตาแซนทินในสภาวะที่มีและปราศจากพาหะนำส่ง	36

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนโคโลนีของเซลล์ที่บ่มร่วมกับแคโรทีนอยด์เปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม	20
ตารางที่ 2 ค่าคงที่ของการลดลงของปริมาณแอสตาแซนทีนในอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่อุณหภูมิ 37 °C	30
ตารางที่ 3 ค่าคงที่ของการนำส่งแอสตาแซนทีนเข้าสู่เซลล์ HepG2 ในสถานะที่มีและไม่มีพาหะนำส่ง	30
ตารางที่ 4 ค่าคงที่ของการลดลงของปริมาณแอสตาแซนทีนที่อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิ 4 °C	31
ตารางที่ 5 ค่าคงที่ของปฏิกิริยาการลดลงของ H ₂ O ₂ โดยเอนไซม์ catalase ที่อุณหภูมิ 37 °C	35
ตารางที่ 6. ค่าคงที่ของปฏิกิริยาการลดลงของ H ₂ O ₂ โดยเอนไซม์ catalase ที่อุณหภูมิ 37 °C ในสถานะที่มีและปราศจากพาหะนำส่ง liposome	37

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่ให้การสนับสนุนเงินทุนในการดำเนินโครงการวิจัยเรื่อง “การผลิตแอสตาแซนทินต้นทุนต่ำและการพัฒนาการนำส่งสารสู่เซลล์”

ขอขอบคุณกลุ่มงานวิจัยรังสีในอุตสาหกรรม โครงการวิจัยรังสีเพื่อการเกษตร สำนักงานปรมาณูเพื่อสันติ ที่ให้ความอนุเคราะห์ยีสต์ *Phaffia rhodozyma* สายพันธุ์ GM807, FN99 และ N78

ขอขอบคุณ นายกิตติชัย ดันสิน นางสาวนบชลี ชีวีวัฒนากุล นางสาววิมล เผ่าดี และนางสุรัตน์ วรรณสมบัติ นักศึกษาปริญญาโท และขอขอบคุณนายธนพล อังคุตรานนท์ นายถิรวัฒน์ พิบูลย์ศักดิ์ นางสาวพรรณพิลาส หวังรอด นางสาวฤดีปกรณ์ อรชุน นางสาววนิดา สันติมานะวงศ์ นางสาววรรธน์ อนันต์ศิริวุฒิ และ นางสาวหทัยชนก วงศ์กาฬสินธุ์ นักศึกษาปริญญาตรี สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร ผู้มีส่วนช่วยในการทำงานวิจัย ทำให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบคุณภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่เอื้อสถานที่ในการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณ ข้าราชการ พนักงาน นักวิทยาศาสตร์ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากรทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกต่างๆ ในการดำเนินโครงการวิจัยนี้เป็นอย่างดี

รศ. ดร. กัลยาณีจิริศรีพงศ์พันธ์

ดร. นวลอนงค์ จิระกาญจนากิจ

ดร. วนิดา วัฒนการุณ

ผู้ดำเนินการวิจัย

31 สิงหาคม 2554

บทคัดย่อ

แอสตาแซนทิน สารแคโรทีนอยด์สีแดงที่นิยมใช้เป็นอาหารเสริมให้สัตว์มีสีขนสวยงามตามความต้องการของผู้บริโภค เป็นสารที่มีคุณสมบัติด้านการเกิดออกซิเดชันที่ดีกว่าแคโรทีนอยด์ชนิดอื่นๆ จึงมีการนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพในการป้องกันการเกิดโรคต่างๆ อย่างไรก็ตามปริมาณการผลิตแอสตาแซนทินที่มีน้อยในยีสต์ ทำให้แอสตาแซนทินมีราคาแพงไม่คุ้มทุนต่อการทำเป็นผลิตภัณฑ์ รวมทั้งปัญหาจากคุณสมบัติการชอบไขมัน (lipophilic) ทำให้แอสตาแซนทินไม่สามารถเข้าสู่เซลล์และเกิดประสิทธิผลที่ดีได้ โครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะลดต้นทุนการผลิตของแอสตาแซนทินโดยการกลายพันธุ์ยีสต์และการใช้วัสดุทางการเกษตรเป็นวัตถุดิบในการเลี้ยงยีสต์ ศึกษาคุณสมบัติต่างๆของแอสตาแซนทินที่ผลิตได้จากยีสต์ รวมทั้งปรับปรุงการนำส่งสารแอสตาแซนทินสู่เซลล์ และทดสอบประยุกต์ใช้ผลิตภัณฑ์แอสตาแซนทินที่ได้

การกลายพันธุ์ยีสต์ *Phaffia rhodozyma* ด้วย Ethyl methanesulphonate (EMS) เพื่อให้ได้สายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ผลิตแคโรทีนอยด์ได้มากขึ้น พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้น EMS มากขึ้น จะมีผลให้อัตราการรอดของเซลล์ลดลงและให้ผลการกลายพันธุ์แตกต่างกันขึ้นกับสายพันธุ์ดั้งเดิมของยีสต์ โดยสายพันธุ์ GM807 และ N78 สามารถกลายพันธุ์ซ้ำและให้โคโลนียีสต์เป็นสีส้มแดง ขณะที่สายพันธุ์ FN99 ให้โคโลนีทั้งสีส้มเหลืองและขาว และเฉพาะสายพันธุ์ GM807 เท่านั้นที่สามารถกลายพันธุ์ให้ยีสต์ที่ผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม 2.7 เท่า แต่เมื่อมีการถ่ายเลี้ยงพบว่าการผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์กลายพันธุ์ไม่คงที่ จึงทำการกลายพันธุ์ซ้ำๆ ต่อไปร่วมกับการคัดเลือกโคโลนีบนอาหารที่มี β -ionone พบว่ายีสต์ที่คัดเลือกได้สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงและค่อนข้างคงที่มากขึ้นกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณแอสตาแซนทินจากยีสต์ด้วย HPLC พบว่าการกลายพันธุ์ด้วย EMS สามารถทำให้ยีสต์กลายพันธุ์มีส่วนการผลิตปริมาณแอสตาแซนทินเพิ่มขึ้นจากเดิม

การศึกษากิจกรรมและการผลิตแคโรทีนอยด์จากยีสต์กลายพันธุ์ที่คัดเลือกคือ GBF8, GBF9 และ S4 ในอาหาร YM เทียบกับ GM807 พบว่า ยีสต์ทั้งสี่สายพันธุ์สามารถเจริญในรูปแบบเดียวกันโดยให้มวลเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วภายในวันที่ 2 และหลังจากนั้นก็คงที่ ขณะที่การผลิตแคโรทีนอยด์จะค่อยๆ เพิ่มขึ้นและมีปริมาณสูงสุดในวันที่ 6 โดย GBF9 เป็นสายพันธุ์ให้ปริมาณแคโรทีนอยด์สูงที่สุด ยีสต์ทั้งสี่สายพันธุ์เจริญได้ดีที่ pH 6.5 แต่ผลิตแคโรทีนอยด์ได้ดีที่ pH ต่ำกว่า การศึกษาอาหารเลี้ยงยีสต์จากผลิตผลทางการเกษตรได้แก่ น้ำสับปะรด น้ำมะพร้าว น้ำฝรั่งและน้ำอ้อย พบว่ายีสต์ทั้งสี่สายพันธุ์สามารถเจริญและให้ปริมาณแคโรทีนอยด์เมื่อเลี้ยงในน้ำสับปะรดได้ดีที่สุด และมากกว่าน้ำมะพร้าว น้ำอ้อยตามลำดับ GBF9 ยังสามารถใช้แหล่งไนโตรเจนราคาถูกของยูเรียได้ดี การปรับสัดส่วนของ C:N ในอาหารเลี้ยงที่เหมาะสมจะทำให้ยีสต์ผลิตแคโรทีนอยด์ได้เพิ่มขึ้น

การศึกษาคูสมบัติของแอสตาแซนทินที่สกัดได้จากยีสต์กลายพันธุ์ในเซลล์เพาะเลี้ยง เปรียบเทียบกับแอสตาแซนทินบริสุทธิ์หรือ β -carotene พบว่าตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับแอสตาแซนทินและ β -

carotene คือ สารละลาย DMSO และ THF ซึ่งสามารถใช้ได้ที่มีความเข้มข้นไม่เกิน 1% สารสกัดแอสตาแซนทินจากยีสต์ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ HeLa, HepG2 และ Vero อีกทั้งไม่มีฤทธิ์ในการทำลายเซลล์มะเร็งเนื่องจากให้อัตราการเจริญของเซลล์เพิ่มขึ้นโดยให้ผลดีที่สุดที่เซลล์ Vero HepG2 และ HeLa ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม แอสตาแซนทินมีผลด้านออกซิเดชันที่เกิดจาก *tert*-butyl hydroperoxide (t-BHP) ได้ดี โดย astaxanthin และ β -carotene จะช่วยให้ความมีชีวิตของเซลล์เพิ่มขึ้น โดยให้ผลการป้องกันเซลล์ Vero ได้ดีกว่าเซลล์ HeLa และการตรวจวัดความสามารถด้าน lipid peroxidation ของแอสตาแซนทินในเซลล์ Vero โดยวัดระดับของ malondialdehyde (MDA) พบว่าแอสตาแซนทินสามารถบรรเทาภาวะเครียดออกซิเดชันที่เกิดขึ้นจาก t-BHP ได้ดี ส่วนการศึกษาคุณสมบัติของแอสตาแซนทินในสภาวะที่ไม่มีเซลล์ โดยวัดความสามารถด้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH assay ใน microplate system พบว่า DMSO เป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุดซึ่งจะไม่มีผลต่อการสลายตัวของสารละลายอนุมูล DPPH การศึกษาหาค่า Effective dose concentration 50% (EC50) พบว่า astaxanthin สังเคราะห์มีฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระมากกว่า β -carotene และ α -tocopherol เป็น 2.85 และ 4.43 เท่าตามลำดับ อย่างไรก็ตามสารสกัดจากยีสต์มีฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระต่ำกว่า เนื่องจากการปนเปื้อนของตัวทำละลายในการสกัด และปริมาณแอสตาแซนทินที่มีอยู่เพียง 74% เมื่อเทียบกับแอสตาแซนทินสังเคราะห์ที่เป็นสารบริสุทธิ์ ซึ่งมีผลให้ความสามารถด้านอนุมูลอิสระของแอสตาแซนทินสกัดจากยีสต์ลดลงได้

การพัฒนาระบบการนำส่งแอสตาแซนทินเข้าสู่เซลล์เพื่อลดข้อจำกัดของแอสตาแซนทิน จากคุณสมบัติความชอบไขมัน ละลายน้ำได้น้อย และความไม่เสถียร ทำโดยใช้สารในกลุ่มพอลิเมอร์ชนิด lipid-based (ได้แก่ methyl- β -cyclodextrin (M β -CD) และ liposome) และสารลดแรงตึงผิว (ได้แก่ tween 80 และ glycerol) และทดสอบกับเซลล์ HepG2 พบว่า tween 80, M β -CD และ glycerol สามารถใช้เป็นพาหะนำส่งในระดับความเข้มข้นที่น้อยกว่า 0.1% (v/v), 0.2% (w/v) และ 2% (v/v) ตามลำดับได้ โดย liposome มีประสิทธิภาพสูงสุดในการนำส่งแอสตาแซนทินเข้าสู่เซลล์ภายในเวลา 24 ชั่วโมง นอกจากนี้พาหะนำส่งยังช่วยรักษาความเสถียรของแอสตาแซนทินได้ดีในสภาวะการบ่มที่อุณหภูมิห้อง แต่ไม่มีผลช่วยรักษาความเสถียรของแอสตาแซนทินได้เมื่อบ่มที่ 4 °C ในที่มีด การประเมินความสามารถในการต้านภาวะเครียดออกซิเดชันของเซลล์จากการกระตุ้นด้วยการฉายรังสีของแอสตาแซนทินเมื่อใช้ liposome เป็นพาหะนำส่ง พบว่าแอสตาแซนทินสามารถลดภาวะเครียดออกซิเดชันได้ดีที่สุดเมื่อให้รังสีและแอสตาแซนทินพร้อมกัน และการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระ catalase ก็ให้ผลทำนองเดียวกันที่สภาวะที่มีแอสตาแซนทินร่วมด้วย ดังนั้นแอสตาแซนทินใน liposome จะมีความเสถียรมากกว่า และให้การปลดปล่อยแอสตาแซนทินได้ช้าๆ เมื่อเทียบกับแอสตาแซนทินบริสุทธิ์ ซึ่งทำให้สามารถนำข้อมูลการศึกษาข้างต้นไปประยุกต์ใช้พัฒนาผลิตภัณฑ์ในการบรรเทาภาวะเครียดออกซิเดชันจากการฉายรังสีได้

คำหลักของโครงการวิจัย: ฟาเฟีย โรโดซัยมา, แอสตาแซนทิน การยับยั้งเซลล์มะเร็ง การต้านอนุมูลอิสระ
ชีวปริมาณออกฤทธิ์ การนำส่ง

Abstract

Astaxanthin, a red carotenoid pigment has been used as additive in animal feeds for colorization. The high antioxidant activity of astaxanthin over other carotenoids has attracted more and more interest for health additive products due to its health benefits to human and degenerative diseases prevention. However, natural astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* yeast is very low which makes it very expensive. In addition, fat-soluble pigment of astaxanthin causes some problem in its availability to biological functions. As a consequence, this research is aimed to improve astaxanthin production at low cost by improving carotenoid content in *Phaffia rhodozyma* via ethyl-methanesulfonate (EMS) mutagenesis and selection for the appropriate medium from agricultural products. Then, properties of astaxanthin from yeast extract including its suitable delivery system to the cells were explored.

Repetitive mutation of *Phaffia rhodozyma* yeast was performed using Ethyl methanesulphonate (EMS). Increasing EMS concentration could lower cell viability as well as mutated yeast. Mutation of GM807 and N78 strains resulted in orange-red colony, while FN99 produced orange, yellow and white colony. Only GM807 gave carotenoid-hyperproducing strains that produced 2.7 times higher carotenoid content than its parental strain. However, repeated yeast mutagenesis and colony selection using β -ionone resulted in quite stable hypercarotenoid producing mutants. The selected strains produced higher astaxanthin content as determined by HPLC.

Growth patterns and carotenoid productions were similar among the select strains of GBF8, GBF9 and S4 as compared to original strain of GM807 in YM medium. Highest cell mass was obtained on day 2, while highest carotenoid production was observed on day 6. The optimum pH for cell growth was at 6.5 whereas; the optimum pH for carotenoid production was relatively lower. Among the selected medium from agricultural products, pineapple juice enhanced growth of all yeast more than coconut juice, sugar cane juice and yeast malt (YM) medium, respectively. Though its carotenoid content was higher in YM medium than that of in pineapple, coconut and sugar cane juice, pineapple juice seemed to be the most applicable and economical supportive medium for yeast growth as well as carotenoid production. The appropriate C:N ratio in culture medium could also provide higher carotenoid production.

Characterization of the extracted astaxanthin from mutant yeast was performed in comparison with synthetic astaxanthin or β -carotene. The best solvents for these carotenoid were DMSO and THF at lower than 1% for Hela, HepG2 and Vero cells. Cytotoxicity of the extracted astaxanthin was not presented whereas it could enhance growth of Vero, HepG2 and Hela cells, consecutively. Additionally, it could diminish toxicity induced by t-BHP which was more effective in Vero than Hela cells. Protective

effect of astaxanthin from oxidative damage induced by t-BHP was demonstrated in both astaxanthin pretreated and post-treated cells by suppression membrane lipid peroxidation. By cell-free DPPH assay, higher scavenging free radicals activity was found for synthetic astaxanthin than β -carotene and α -tocopherol. The Effective dose concentration 50% (EC50) of astaxanthin was higher than β -carotene and α -tocopherol for 2.85 and 4.43 times, respectively. The relatively low activity in the extracted astaxanthin was possibly due to contaminated solvent and the lower content of astaxanthin at 74% in the extract as compared to synthetic astaxanthin.

Limitation in bioavailability and antioxidant activity of astaxanthin due to its low solubility and instability was overcome by using delivery system of lipid based polymer and surfactant. The tween 80, M β -CD and glycerol could be used at concentration of less than 0.1% (v/v), 0.2% (w/v) and 2% (v/v), respectively. Liposome and β -cyclodextrin could lessen the degradation rate of astaxanthin at room temperature but showed no difference at 4 °C in the dark. Cellular uptake rate of astaxanthin was highest for liposome as compared to those by β -cyclodextrin and tween 80. Assessment of antioxidant activity in HepG2 cells from UV inducing oxidative stress showed that astaxanthin could lessen MDA level as well as increase catalase activity. Additionally, astaxanthin with liposome could stabilize its antioxidant activity as compared with astaxanthin alone. Thus, these informative data could be useful as model for effective use of astaxanthin in reduction of oxidative stress induced by UV.

Keywords: *P. rhodozyma*, astaxanthin, anticancer, antioxidant, bioavailability, delivery

Executive summary

รหัสโครงการ: DBG5180019

ชื่อโครงการ: การผลิตแอสตาแซนทินต้นทุนต่ำและการพัฒนาการนำส่งสารสู่เซลล์

คณะผู้วิจัย:	ร.ศ. ดร. กัลยาณี จิรศรีพงศ์พันธ์	มหาวิทยาลัยศิลปากร
	ดร. นวลอนงค์ จิระกาญจนากิจ	มหาวิทยาลัยมหิดล
	ดร. วนิดา วัฒนการุณ	มหาวิทยาลัยศิลปากร

หลักการและเหตุผล: แอสตาแซนทิน นอกจากใช้เป็นอาหารเสริมเพื่อให้สัตว์มีสีส้มสวยงามแล้วยังนิยมนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพเพื่อป้องกันการเกิดโรคต่างๆ จากการมีคุณสมบัติด้านการเกิดออกซิเดชันที่ดีกว่าแคโรทีนอยด์ชนิดอื่นๆ แต่แอสตาแซนทินที่ผลิตได้จากยีสต์สายพันธุ์ในธรรมชาติมีปริมาณน้อย ทำให้มีราคาแพงและไม่คุ้มทุนกับการทำเป็นผลิตภัณฑ์ รวมทั้งยังมีปัญหาจากคุณสมบัติการชอบไขมัน (lipophilic) ทำให้แอสตาแซนทินจากผลิตภัณฑ์เข้าสู่เซลล์ได้ไม่ดี หรือทำให้การนำแอสตาแซนทินไปใช้ได้ประสิทธิภาพไม่ดีเท่าที่ควร

วัตถุประสงค์: โครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะลดต้นทุนการผลิตของแอสตาแซนทิน โดยการกลายพันธุ์ยีสต์เพื่อเพิ่มผลผลิต และการใช้วัสดุจากผลิตผลทางการเกษตรเป็นวัตถุดิบในการเลี้ยงยีสต์ แล้วจึงศึกษาคุณสมบัติต่างๆ ของแอสตาแซนทินที่ผลิตได้จากยีสต์ รวมทั้งศึกษาการนำส่งแอสตาแซนทินสู่เซลล์เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์ต่างๆต่อไป

ผลการศึกษา: การกลายพันธุ์ยีสต์ *Phaffia rhodozyma* ด้วย Ethyl methanesulphonate ซ้ำๆ หลายครั้งร่วมกับการคัดเลือกโคโลนีบนอาหารที่มี β -ionone ทำให้ได้สายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ผลิตแคโรทีนอยด์ได้มากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมและมีสัดส่วนของปริมาณแอสตาแซนทินเพิ่มขึ้น นอกจากนี้การผลิตแคโรทีนอยด์ก็ค่อนข้างคงที่มากขึ้นกว่าสายพันธุ์เดิม การเจริญของยีสต์แต่ละสายพันธุ์มีรูปแบบเดียวกันโดยให้มวลเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วภายในวันที่ 2 ขณะที่การผลิตแคโรทีนอยด์จะค่อยๆ เพิ่มขึ้นและมีปริมาณสูงสุดในวันที่ 6 การลดต้นทุนการผลิตโดยใช้วัสดุจากการเกษตรเป็นวัตถุดิบในการเลี้ยงยีสต์ พบว่าน้ำสับปะรดมีคุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ได้ดีกว่าน้ำมะพร้าว น้ำฝรั่งและน้ำอ้อย ที่นำมาทดสอบ

การศึกษาคูณสมบัติของแอสตาแซนทินที่สกัดได้จากยีสต์กลายพันธุ์ เปรียบเทียบกับแอสตาแซนทินบริสุทธิ์หรือ β -carotene ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง Hela และ HepG2 เปรียบเทียบกับเซลล์ Vero พบว่าไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์แต่กลับมีผลให้อัตราการเจริญของเซลล์เพิ่มขึ้นโดยเฉพาะกับเซลล์ Vero แสดงว่าแอสตาแซนทินไม่มีฤทธิ์ในการทำลายเซลล์มะเร็งทั้งสองชนิดนี้ และเมื่อวิเคราะห์ความสามารถด้านออกซิเดชันที่เกิดจาก t-BHP พบว่าความมีชีวิตของเซลล์ลดลงเมื่อความเข้มข้นของ t-BHP มากขึ้นตามลำดับ แต่ในสภาวะที่มี astaxanthin และ β -carotene จะช่วยให้ความมีชีวิตของเซลล์เพิ่มขึ้นในระดับต่างๆกัน โดยแอสตาแซนทินให้ผลการป้องกันเซลล์ ดีกว่า β -carotene และสามารถ

บรรเทาภาวะเครียดออกซิเดชันที่เกิดขึ้นได้ทำให้ได้ค่าของ MDA ต่ำกว่าสภาวะที่มีตัวกระตุ้น t-BHP อย่างเดียว ผลการทดสอบความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดย DPPH assay แสดงให้เห็นว่า astaxanthin มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่า β -carotene และ α -tocopherol เป็น 2.85 และ 4.43 เท่าตามลำดับ

การทดสอบประสิทธิภาพของพาหะนำส่งในระดับที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ พบว่า liposome มีประสิทธิภาพสูงสุดในการนำส่งแอสตาแซนทินเข้าสู่เซลล์ภายในเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับ methyl β -cyclodextrin และ tween 80 พาหะนำส่งยังช่วยรักษาความเสถียรของแอสตาแซนทินในอาหารเลี้ยงเซลล์ได้ดีกว่าสภาวะที่ปราศจากพาหะนำส่ง และเมื่อประเมินความสามารถในการต้านภาวะเครียดออกซิเดชันของเซลล์จากการฉายรังสียูวีโดยใช้ liposome เป็นพาหะนำส่ง พบว่าสามารถลดการสันดาปไขมันและส่งเสริมค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ catalase เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะที่ไม่มีแอสตาแซนทิน แต่ไม่สามารถบรรเทาภาวะเครียดได้ดีเท่ากับเซลล์ปกติที่ไม่มีการฉายรังสี โดยการต้านภาวะเครียดออกซิเดชันและการลดปริมาณสารอนุมูลอิสระโดยเอนไซม์ได้ผลดีเมื่อบ่มเซลล์กับแอสตาแซนทินทั้งในสภาวะที่มีและปราศจาก liposome พร้อมกับการฉายรังสี

สรุปผล: การศึกษาวิจัยนี้ทำให้ได้ยีสต์สายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ผลิตแคโรทีนอยด์ได้มากขึ้นและค่อนข้างคงที่มากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม และยังมีสัดส่วนของปริมาณแอสตาแซนทินเพิ่มขึ้น โดยสามารถใช้ น้ำสับปะรดเป็นวัตถุดิบราคาถูกในการเลี้ยงยีสต์ เนื่องจากการที่มีคุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ได้ดีที่สุด คุณสมบัติของแอสตาแซนทินที่สกัดได้จากยีสต์กลายพันธุ์ไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง Hela และ HepG2 แต่สามารถต้านภาวะเครียดออกซิเดชันที่เกิดจาก t-BHP ได้ดีกว่า β -carotene การใช้ liposome เป็นพาหะช่วยให้การนำส่งแอสตาแซนทินเข้าสู่เซลล์มีประสิทธิภาพมากขึ้น และยังช่วยในการรักษาความเสถียรของแอสตาแซนทินได้

ประโยชน์ที่ได้จากการวิจัย: งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการเพิ่มปริมาณการผลิตแอสตาแซนทินจากยีสต์ โดยการกลายพันธุ์ยีสต์และการใช้วัสดุทางการเกษตรราคาถูกเป็นวัตถุดิบในการผลิต รวมทั้งการหาสภาวะการผลิตที่เหมาะสม ซึ่งจะทำให้ได้ปริมาณแอสตาแซนทินในราคาต้นทุนที่ต่ำกว่าการใช้อาหารดั้งเดิมได้ ข้อมูลดังกล่าวจะเป็นประโยชน์ต่อการผลิตในระดับอุตสาหกรรมในประเทศ ที่จะช่วยลดการนำเข้าและช่วยให้ผลิตภัณฑ์ที่มีการใช้แอสตาแซนทินเป็นองค์ประกอบมีราคาถูกลง การศึกษาคุณสมบัติแอสตาแซนทินทำให้ได้ข้อมูลที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์ได้ตามความเหมาะสมกับคุณสมบัติของสาร ไม่ว่าจะเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง หรืออาหารเสริมของคน และข้อมูลของการนำส่งแอสตาแซนทินโดยใช้พาหะนำส่งที่เหมาะสม ความเสถียรของสารในสภาวะต่างๆ ทำให้ได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อการนำไปประยุกต์กับผลิตภัณฑ์ต่างๆ โดยใช้ปริมาณเริ่มต้นของสารที่ต่ำลงได้ ซึ่งจะเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ให้ยิ่งคุ้มค่ายิ่งขึ้น

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

Astaxanthin เป็นคาโรทีนอยด์สีแดงที่นิยมใช้และยอมรับให้เป็นอาหารเสริมในการเลี้ยงสัตว์ (Code of Federal Regulations 21 CFR 73.35) เพื่อให้สัตว์มีสีสวยงามตามความต้องการของผู้บริโภค และขายได้ในราคาดี Astaxanthin เป็นสารในกลุ่มเทอร์พีน (terpene) ที่มีโครงสร้างคล้ายคาโรทีนอยด์ชนิดต่างๆ แต่มีสมบัติด้านการเกิดออกซิเดชันได้ดีกว่าคาโรทีนอยด์อื่นๆ (Cornnor and Brien 1998) จึงนิยมนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสำหรับมนุษย์มากขึ้น เนื่องจากเป็นสารที่มีคุณสมบัติเป็นประโยชน์ต่อสุขภาพมากมาย ดังรายงานที่มีมาแล้วต่อไปนี้ คือ 1) การเป็นสารที่มีสมบัติต้านออกซิเดชันที่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระที่นำไปสู่อาการเสื่อมทางสุขภาพและการเกิดโรคต่างๆ (anti-degenerative disease) เช่น การแก่ โรคหัวใจขาดเลือด โรคความเสื่อมทางระบบประสาท (Hussein, 2006) และโรคมะเร็ง (Teo et al. 2005) 2) คุณสมบัติป้องกันการเกิดแผลในกระเพาะอาหารที่เกิดจากยา naproxen และแอลกอฮอล์ (Kim et al. 2005a; 2005b) และ *Helicobacter pylori* (Wang et al, 2000) และ 3) คุณสมบัติช่วยการตอบสนองระบบภูมิคุ้มกันของหนู BALB/C โดยกระตุ้น spleen cells ให้สร้าง polyclonal antibody เพิ่มขึ้น (Okai and Okai 1996) เป็นต้น จากคุณสมบัติต่างๆข้างต้น จึงมีการนำ astaxanthin มาเป็นองค์ประกอบในผลิตภัณฑ์ต่างๆ เพิ่มมากขึ้น ไม่ว่าจะเป็นอาหารเลี้ยงสัตว์ อาหารเสริมสำหรับมนุษย์และเครื่องสำอาง อย่างไรก็ตาม การใช้ astaxanthin มักมีปัญหาเดียวกัน คือ การไม่สามารถใช้ประโยชน์อย่างเต็มที่ของ astaxanthin ในผลิตภัณฑ์ได้ อันเนื่องมาจากสมบัติการชอบไขมัน (lipophilic) ของ astaxanthin (Lockwood, 2003) ที่ทำให้ผลิตภัณฑ์เข้าสู่เซลล์ได้ไม่ดี นอกจากนี้ การนำไปใช้ประโยชน์เป็นผลิตภัณฑ์ยังประสบปัญหาจากการที่ astaxanthin ที่ผลิตได้จากยีสต์ *Phaffia rhodozyma* หรือ *Xanthophyllomyces dendrorhous* มีปริมาณน้อย ซึ่งมีผลทำให้ astaxanthin มีราคาแพง ไม่คุ้มทุนต่อการนำมาทำเป็นผลิตภัณฑ์ (ประมาณ 2000-2500 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัม) ดังนั้น โครงการวิจัยนี้ จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะลดต้นทุนการผลิตของ astaxanthin ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญเริ่มต้นที่ต้องแก้ไข เพื่อให้ได้ปริมาณการผลิตมากขึ้นในต้นทุนการผลิตที่ต่ำลง โดยการกลายพันธุ์ยีสต์และใช้วัสดุราคาถูกจากการเกษตรมาเป็นอาหารเลี้ยงยีสต์ จากนั้นศึกษาวิเคราะห์สมบัติต่างๆของ astaxanthin ที่ผลิตได้จากยีสต์ซึ่งเป็นประโยชน์ในการนำไปประยุกต์เป็นผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพ โดยเฉพาะคุณสมบัติต้านออกซิเดชัน และการต้านเซลล์มะเร็ง จากนั้นจึงปรับปรุงสมบัติของผลิตภัณฑ์ในการนำส่งสาร astaxanthin แก่เซลล์ เพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานของการนำส่งสารสำหรับใช้ในผลิตภัณฑ์ต่างๆต่อไป โดยการศึกษาวิจัยดังกล่าว จะทำให้เกิดการเพิ่มมูลค่าของวัสดุเหลือทิ้งที่เป็นผลผลิตทางการเกษตร ช่วยเพิ่มโอกาสการนำแอสตาแซนทีนไปใช้ได้มากขึ้น ส่งผลให้เกิดการพึ่งพาตนเองของประเทศ และสามารถทำให้เกิดการพัฒนาทางด้านผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพของทั้งคน และของสัตว์ในประเทศได้ต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์

1. เพื่อลดต้นทุนการผลิตแอสตาแซนทิน โดยการกลายพันธุ์ยีสต์ร่วมกับการใช้แหล่งอาหารที่มีราคาถูกจากวัสดุทางการเกษตร
2. ศึกษาหาสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมที่ทำให้การผลิตแอสตาแซนทินสูงขึ้น
3. ศึกษาวิเคราะห์คุณสมบัติของแอสตาแซนทินที่สกัดได้จากยีสต์ที่เพาะเลี้ยงได้เทียบกับแอสตาแซนทินบริสุทธิ์
4. ศึกษาปรับปรุงการนำส่งแอสตาแซนทิน และตรวจสอบประสิทธิภาพการนำส่งแอสตาแซนทินสู่เซลล์

ระเบียบวิธีวิจัย

1. การเพิ่มผลผลิตแอสตาแซนทิน โดยการกลายพันธุ์ยีสต์ให้สามารถผลิตแอสตาแซนทินสูงขึ้น จากนั้นตรวจสอบความสามารถผลิตแอสตาแซนทินของสายพันธุ์กลายพันธุ์ในอาหาร YM เพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่ผลิตแอสตาแซนทินสูงขึ้น

2. การลดต้นทุนการผลิตแอสตาแซนทิน โดยการเพาะเลี้ยงสายพันธุ์กลายพันธุ์ในอาหารที่เป็นวัสดุจากการเกษตร แล้วหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแอสตาแซนทินในอาหารนั้น ในขั้นตอนนี้จะนำสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่เหมาะสมมาเลี้ยงในอาหารที่เป็นวัสดุจากการเกษตร โดยพิจารณาจากมวลยีสต์ และปริมาณแอสตาแซนทินที่ผลิตได้ เพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่ผลิตแอสตาแซนทินได้ดีที่สุด จากนั้นจะใช้สายพันธุ์นั้นมาเป็นแบบจำลองหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงยีสต์เพื่อผลิตแอสตาแซนทินให้สูงขึ้น โดยศึกษาหาความเข้มข้นของอาหารหรือปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากช่วงความเข้มข้นต่างๆตั้งแต่ 2.5-50 % (v/v) ซึ่งเมื่อได้ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนในอาหารเหมาะสมแล้ว จะหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม โดยพิจารณาเลือกแหล่งไนโตรเจนที่มีรายงานแล้วว่าสามารถทำให้ยีสต์ผลิตแอสตาแซนทินสูงได้ เช่น $\text{urea} + \text{NaH}_2\text{PO}_4$, KNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, beef extract และ $\text{KNO}_3 + (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + \text{beef extract}$ จากนั้นจะใช้ระบบบัพเฟอร์มาเตรียมอาหาร (ที่มีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนเหมาะสมแล้ว) ให้ได้ความเป็นกรดต่างในช่วง 4-5 ที่ให้การผลิตแอสตาแซนทินสูงขึ้น และสุดท้ายศึกษาหาสัดส่วนของคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสม ซึ่งจะให้ได้ข้อมูลสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแอสตาแซนทินจากยีสต์ได้

3. การตรวจสอบบัติต่างๆ ของแอสตาแซนทินที่สกัดได้จากยีสต์ โดยการศึกษาหาความสามารถด้านออกซิเดชันเทียบกับ β -carotene ทั้งในระบบที่เป็น cell system และ cell free system โดยตรวจสอบในระบบ cell system จะต้องทำการตรวจสอบความเป็นพิษของแอสตาแซนทินที่สกัดได้จากยีสต์ก่อน หลังจากนั้นจึงนำความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอสตาแซนทิน มาตรวจสอบความสามารถลดภาวะเครียดออกซิเดชันที่เกิดจาก *tert*-butyl hydroperoxide ด้วยการวัดจำนวนเซลล์มีชีวิตที่เหลืออยู่ (cell

viability assay) และวัดความสามารถด้าน lipid peroxidation โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี MTT assay และ Thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) assay ตามลำดับ รวมทั้งตรวจสอบสมบัติด้านอนุมูลอิสระของ Astaxanthin และ β -carotene เทียบกับ α -tocopherol ในระบบ cell free system ด้วยวิธี DPPH assay จากนั้นตรวจสอบความสามารถทำลายเซลล์มะเร็ง Hela และ HepG2 ของแอสตาแซนทินเทียบกับเซลล์ Vero โดยตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay และ cologenic assay

4. การปรับปรุงการนำส่งแอสตาแซนทินสู่เซลล์และการประเมินประสิทธิภาพการนำส่ง โดยขั้นแรกจะประเมินเลือกใช้พาหะนำส่งที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ทั้งพอลิเมอร์ชนิด lipid-based และสาร surfactant ได้แก่ สารในกลุ่ม Tween จากนั้นศึกษาประสิทธิภาพการนำส่งของพาหะนำส่งในเซลล์ไลน์ โดยมีการเปรียบเทียบกับแอสตาแซนทินที่อยู่ในสารละลายด้วย และเมื่อได้พาหะที่เหมาะสมจะทำการออกแบบแบบจำลอง/ระบบทางคณิตศาสตร์ในการอธิบายกลไกของระบบการนำส่ง astaxanthin ที่พัฒนาข้างต้นต่อไป

การดำเนินงานวิจัย

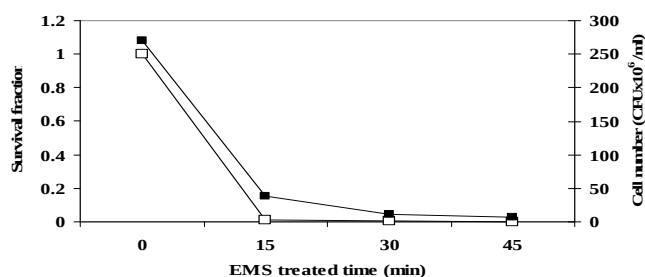
ส่วนที่ 1 การลดต้นทุนการผลิตแอสตาแซนทิน

ยีสต์ที่สามารถผลิตแอสตาแซนทินได้มากกว่าแคโรทีนอยด์ตัวอื่นๆ ส่วนใหญ่เป็นยีสต์ในกลุ่ม *Phaffia rhodozyma* และ *Xanthophyllomyces dendrorhous* โดยสายพันธุ์ที่นำมาทำการกลายพันธุ์ในงานวิจัยนี้เป็น *Phaffia rhodozyma* ที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วยรังสีแกมมา และรังสีนิวตรอนมาแล้ว และมีสายพันธุ์เป็น GM807, FN99 และ N78 ตามลำดับ ซึ่งเป็นยีสต์ที่ได้รับการอนุเคราะห์จากกลุ่มงานวิจัยรังสีในอุตสาหกรรม โครงการวิจัยรังสีเพื่อการเกษตร สำนักงานปรมาณูเพื่อสันติ อย่างไรก็ตาม ยีสต์สายพันธุ์ดังกล่าวมีความสามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้ไม่เสถียร การถ่ายเลี้ยงเรื่อยๆทำให้ยีสต์มีการผลิตแคโรทีนอยด์ลดลง ดังเช่นข้อมูลที่รายงานโดย An et al (1989) ว่าสายพันธุ์กลายพันธุ์ส่วนใหญ่มักไม่เสถียร และมีการผลิตแคโรทีนอยด์ลดลงเรื่อยๆ ซึ่งจากการตรวจสอบความสามารถผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์สายพันธุ์ดังกล่าว ด้วยการบ่มเลี้ยงในอาหาร YM แล้ววิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ได้จากยีสต์ พบว่าความสามารถผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์ดังกล่าวเป็น 200, 260 และ 200 $\mu\text{g/g}$ yeast ตามลำดับ ซึ่งเป็นระดับที่เท่าปริมาณแคโรทีนอยด์ที่พบในยีสต์สายพันธุ์ตามธรรมชาติ งานวิจัยจากนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะทำการกลายพันธุ์ยีสต์เพื่อปรับปรุงความสามารถผลิตแคโรทีนอยด์ให้มากขึ้น และให้ได้สายพันธุ์ที่มีการผลิตแคโรทีนอยด์เสถียรขึ้น

1.1 การเพิ่มผลผลิตโดยการกลายพันธุ์ยีสต์

1.1.1 การกลายพันธุ์ยีสต์ด้วย Ethyl-methanesulfonate (EMS)

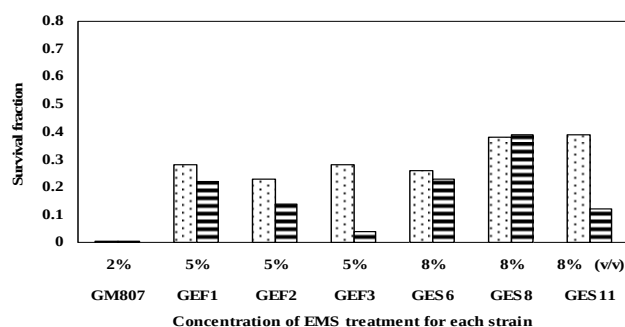
การกลายพันธุ์ยีสต์สามารถทำได้หลายวิธีทั้งการใช้สารเคมี และรังสี ในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้สารเคมี เนื่องจากการกลายพันธุ์ด้วยสารก่อการกลายพันธุ์หลากหลายชนิด (หลังจากผ่านรังสีแกมมา และนิวตรอน) น่าจะเพิ่มโอกาสการได้สายพันธุ์กลายพันธุ์มากขึ้น และต้องใช้ EMS แทน (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) NTG ที่ต้องการใช้ในการวางแผนวิจัยเริ่มแรก เนื่องจาก NTG เป็นสารอันตรายที่ไม่สามารถสั่งซื้อมาใช้ในการวิจัยนี้ได้ อย่างไรก็ตามการกลายพันธุ์ได้ดำเนินการโดยการเลี้ยงยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ในอาหาร YM เป็นเวลา 1-2 วัน ซึ่งเป็นระยะที่เซลล์มีการเจริญดี ที่ความหนาแน่นเซลล์ 10^8 cell/ml มาบ่มกับ EMS ที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆ โดยในการกลายพันธุ์ครั้งแรก ได้ใช้ EMS ที่ความเข้มข้น 2 % (v/v) เป็นเวลา 15, 30 และ 45 นาที พบว่าการบ่มเซลล์ยีสต์ทั้งสามสายพันธุ์กับ EMS จะให้ผลในลักษณะเดียวกัน คือ การบ่มที่เวลาสั้นจะมีปริมาณเซลล์มีชีวิต หรือสัดส่วนการรอดสูงกว่าการบ่มที่ระยะเวลานานดังแสดงในรูปที่ 1 โดยสัดส่วนการรอดของเซลล์ที่น้อยกว่า 20 % ที่เวลา 15 นาทีขึ้นไป เซลล์ที่มีชีวิตน่าจะเป็นเซลล์ที่มีโอกาสเป็นสายพันธุ์กลายพันธุ์สูงตามการศึกษาของ An *et al* (1989) และ Sun *et al* (2004) ที่พบว่าสภาวะที่มีรังสี หรือสารกลายพันธุ์ที่ให้อัตราการรอดต่ำๆ จะทำให้เกิดสภาวะไม่เหมาะสม และทำให้ยีสต์ที่รอดชีวิตมีคุณสมบัติเพิ่มปริมาณการผลิตแคโรทีนอยด์มากขึ้น เพื่อป้องกันตัวเซลล์เองจากปัจจัยดังกล่าว จึงทำให้มีโอกาสได้สายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ผลิตแคโรทีนอยด์สูงขึ้น



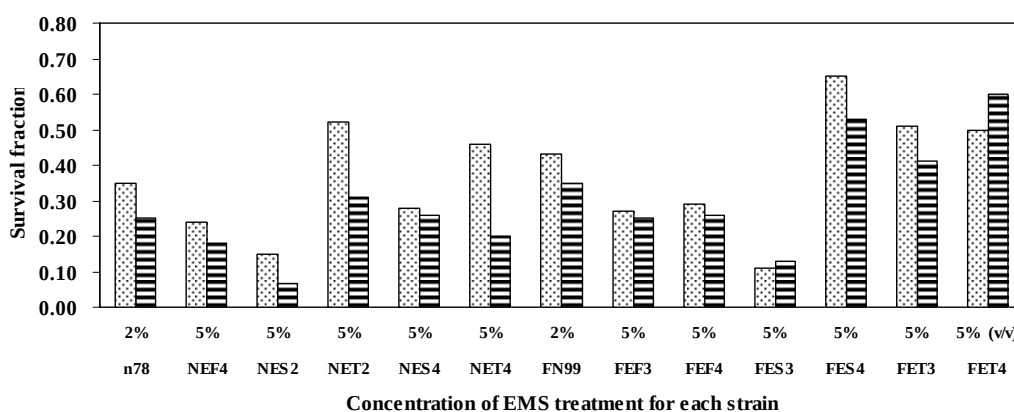
รูปที่ 1 สัดส่วนการรอดชีวิต (□ survival fraction) และปริมาณเซลล์มีชีวิต (■ survival cells/ml) ของเชื้อ GM807 หลังการบ่มกับ EMS ที่ความเข้มข้น 20 µl/ml (2% v/v) เป็นเวลา 15, 30 และ 45 นาที

จากการสังเกตลักษณะความเข้มของสีพบว่าโคโลนีจากการกลายพันธุ์ให้สีเข้มมากกว่าสายพันธุ์ GM807 เดิม ขณะที่ขนาดโคโลนีของเซลล์ที่ผ่านการบ่มกับ EMS ที่ระยะการบ่ม 30 นาที มีขนาดใหญ่กว่าที่ 45 และ 15 นาทีและใหญ่กว่า GM807 เดิมตามลำดับ โคโลนีที่มีสีเข้มและมีขนาดใหญ่ทุกกลุ่มจะนำไปวิเคราะห์หาปริมาณแคโรทีนอยด์ โดยเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิมของแต่ละเชื้อก่อนการคัดกรองเลือกเชื้อไปทำการกลายพันธุ์ซ้ำ ยีสต์ที่ผ่านการกลายพันธุ์จากยีสต์ GM807 คือ สายพันธุ์ GEF1, GEF2 และ GEF3 มีปริมาณการผลิตแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้น เมื่อนำมากลายพันธุ์ซ้ำ พบว่ามีความต้านทาน

ต่อความเป็นพิษของ EMS สูงขึ้นกว่าสายพันธุ์เดิม และมีสัดส่วนการรอดของเซลล์สูงกว่า GM807 ที่ความเข้มข้นของ EMS ที่เพิ่มขึ้น และระยะเวลาการบ่มนานขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 สัดส่วนการรอดชีวิตของเซลล์ยีสต์สายพันธุ์ GM807 และสายพันธุ์กลายพันธุ์หลังการบ่มกับ EMS ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 30 นาที (□) และ 45 นาที (■) โดยที่สายพันธุ์ GEF ได้จากการกลายพันธุ์ครั้งที่ 1 และสายพันธุ์ GES ได้จากการกลายพันธุ์ครั้งที่ 2



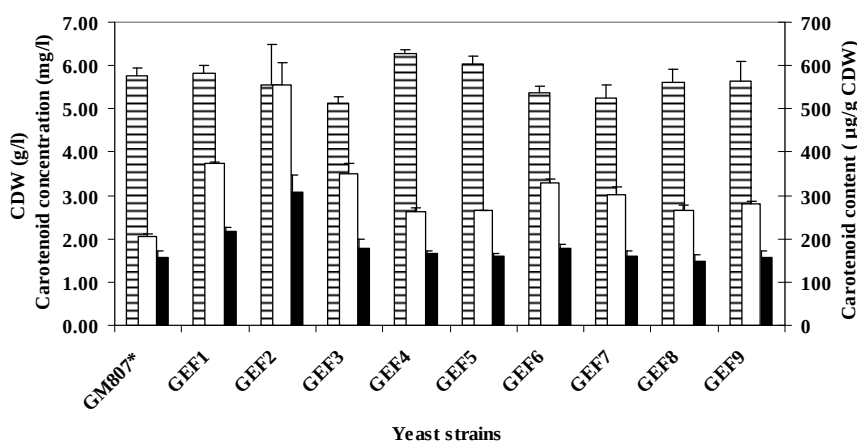
รูปที่ 3 สัดส่วนการรอดชีวิตของเซลล์ยีสต์สายพันธุ์ N78, FN99 และสายพันธุ์กลายพันธุ์หลังการบ่มกับ EMS ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 15 นาที (□) และ 30 นาที (■) โดยที่สายพันธุ์ NEF และ FEF ได้จากการกลายพันธุ์ครั้งที่ 1 สายพันธุ์ NES และ FES ได้จากการกลายพันธุ์ครั้งที่ 2 และสายพันธุ์ NET และ FET ได้จากการกลายพันธุ์ครั้งที่ 3

ส่วนการกลายพันธุ์ยีสต์ N78 และ FN99 พบว่าการเพิ่มเวลาหรือความเข้มข้นของ EMS เซลล์มีอัตราการรอดลดลง แต่กรณีที่ความเข้มข้นคงเดิม อัตราการรอดของเซลล์ก็สูงขึ้นทั้งในการกลายพันธุ์ซ้ำครั้งที่ 2 และ 3 ดังแสดงในรูปที่ 3 โดยในการกลายพันธุ์ซ้ำครั้งที่สองพบว่ายีสต์มีขนาดโคโลนีเล็กลงและมีสีเข้มไม่แตกต่างจากสายพันธุ์เดิมจากการสังเกตด้วยตาเปล่า นอกเหนือจากนี้พบว่ามิโคโลนีสีเหลืองและสีขาวเพิ่มขึ้นจากการตรวจสอบดูใต้กล้อง โดยเซลล์หลังการกลายพันธุ์จะให้โคโลนียีสต์สีเหลืองขนาดเล็กจำนวนมาก ขณะที่ยีสต์โคโลนีสีขาวพบมีเซลล์ขนาดใหญ่เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ก่อนการกลาย

พันธุ์ จึงอาจเป็นไปได้ว่าการกลายพันธุ์ N78 และ FN99 ด้วย EMS ซ้ำๆ มีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของยีนสร้างแอสตาแซนทินทำให้ไม่สามารถนำ β -carotene ไปใช้ แล้วเกิดการสะสม β -carotene ทำให้เห็นโคโลนีเป็นสีเหลือง ส่วนยีสต์ที่โคโลนีสีขาวอาจมีการเปลี่ยนยีนที่สังเคราะห์ β -carotene และแอสตาแซนทินให้ไม่ทำงาน ทำให้ไม่มีการสะสมของแอสตาแซนทินและ β -carotene ในยีสต์ แล้วให้โคโลนีเป็นสีขาว ตามข้อมูลวิธีการสร้างแอสตาแซนทินของ *Phaffia rhodozyma* ที่รายงานโดย Visser et al. (2003)

1.1.2 การคัดเลือกจากความสามารถในการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์กลายพันธุ์

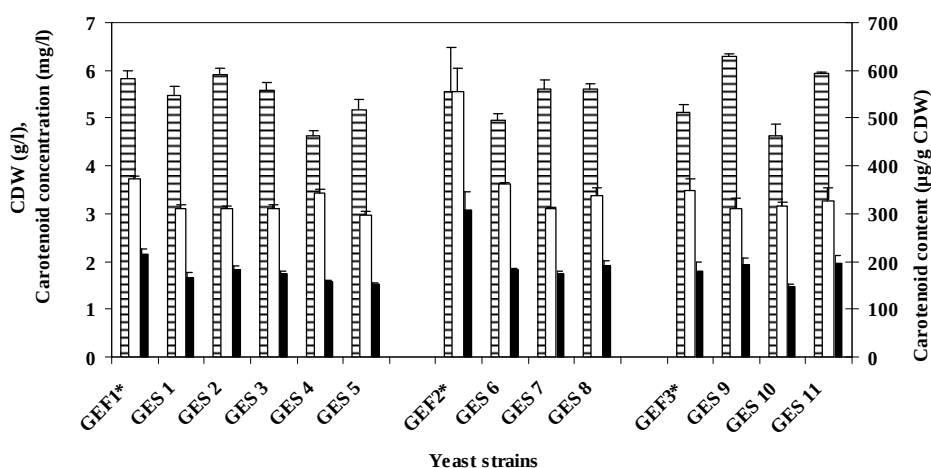
การกลายพันธุ์ยีสต์ GM807 สามารถคัดแยกเชื้อกลายพันธุ์ได้จำนวน 9 โคโลนี ที่มีการเจริญดีหรือให้โคโลนีสีเข้ม นำมาเลี้ยงเพื่อเปรียบเทียบการเจริญของเซลล์และการผลิตแคโรทีนอยด์ต่อน้ำหนักแห้งของยีสต์เทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม ซึ่งได้ข้อมูลดังแสดงในรูปที่ 4



รูปที่ 4 ความสามารถเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์จากยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิม GM807 และยีสต์ที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วย EMS ที่ 2% (v/v) โดย ▨ เป็นน้ำหนักเซลล์แห้ง (g/l) ■ เป็นความเข้มข้นแคโรทีนอยด์ (mg/l) □ เป็นปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อน้ำหนักยีสต์ (µg/g) GM807 เป็นสายพันธุ์ดั้งเดิมและ GEF คือสายพันธุ์ที่ได้จากการกลายพันธุ์ครั้งที่ 1

พบว่ายีสต์กลายพันธุ์ส่วนใหญ่ที่คัดเลือกได้มีการเจริญเติบโตให้มวลเซลล์อยู่ในช่วงใกล้เคียงกัน ขณะที่สายพันธุ์ GEF4 และ GEF5 มีการเจริญของเซลล์สูงกว่าสายพันธุ์ GM807 อย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อพิจารณาความสามารถสร้างแคโรทีนอยด์ของสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ พบว่ายีสต์ GEF1, GEF2 และ GEF3 เป็นสายพันธุ์ที่ให้ปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อน้ำหนักยีสต์ดีกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมเป็น 1.83, 2.72, 1.71 เท่าตามลำดับ จึงนำทั้งสามสายพันธุ์ไปกลายพันธุ์ในครั้งต่อไป นอกจากนี้ได้นำเชื้อทั้งสามและสายพันธุ์ดั้งเดิมมาศึกษาความสามารถการผลิตแคโรทีนอยด์ที่การถ่ายเลี้ยง 5 รุ่น เพื่อดูความเสถียรในการผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์ที่คัดเลือกไว้ด้วย

จากการกลายพันธุ์ครั้งที่ 2 โดยใช้สายพันธุ์ GEF1, GEF2 และ GEF3 คัดเลือกได้รุ่นลูกที่มีลักษณะของขนาดโคโลนีที่ใหญ่กว่าหรือสีที่เข้มกว่าในจำนวนของเชื้อที่ได้จำนวน 11 โคโลนี (GES) มาศึกษาการเจริญและความสามารถผลิตแคโรทีนอยด์ (รูปที่ 5) พบว่าสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้มีการเจริญเติบโตให้มวลอยู่ในช่วงไม่แตกต่างหรือลดลงจากสายพันธุ์ดั้งเดิมเล็กน้อย ส่วน GES9 และ GES11 ที่มาจากสายพันธุ์ GEF3 พบว่ามีการเจริญให้มวลสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม ส่วนการผลิตแคโรทีนอยด์พบว่าสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้จากกลุ่ม GEF1 และ GEF2 มีปริมาณการผลิตลดลงจากสายพันธุ์ดั้งเดิม ขณะที่สายพันธุ์จากกลุ่ม GEF3 แม้จะมีปริมาณการผลิตแคโรทีนอยด์ลดลงจากสายพันธุ์ดั้งเดิม แต่เมื่อพิจารณาข้อมูลการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์พบว่า GES6, GES8 และ GES11 ยังคงให้ปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อยีสต์สูงกว่า GM807 เป็น 1.7-1.8 เท่า และให้ปริมาณการผลิตแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้นเป็น 1.16-1.25 เท่า ดังนั้น จึงนำยีสต์ดังกล่าวมากลายพันธุ์ซ้ำต่อไป

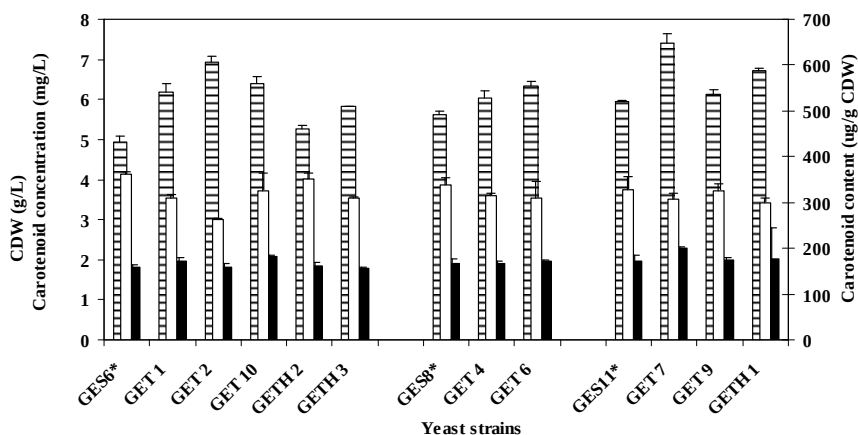


รูปที่ 5 ความสามารถเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์จากยีสต์ดั้งเดิม (*) และยีสต์ที่ผ่านการกลายพันธุ์ซ้ำด้วย EMS ที่ 5 % (v/v) โดย ▨ เป็นน้ำหนักเซลล์แห้ง (g/l) ■ เป็นความเข้มข้นแคโรทีนอยด์ (mg/l) □ เป็นปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อน้ำหนักยีสต์ (µg/g),

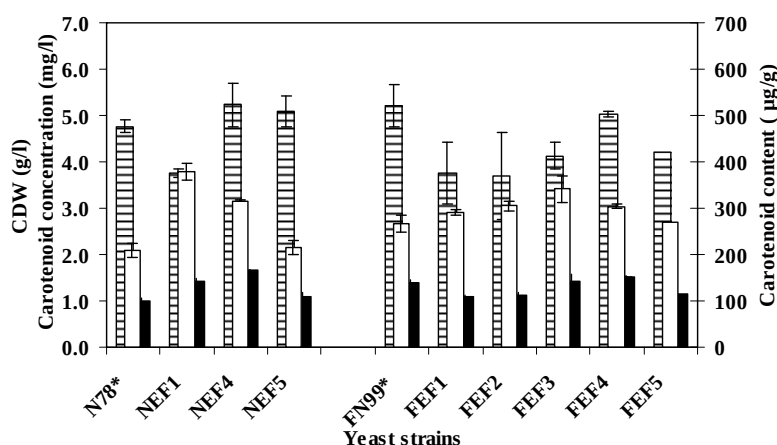
* แสดงถึงสายพันธุ์เริ่มต้นที่นำมากลายพันธุ์ในแต่ละกลุ่ม

การกลายพันธุ์ครั้งที่ 3 โดยใช้สายพันธุ์ GES6, GES8 และ GES11 มากลายพันธุ์แล้วคัดเลือกรุ่นลูกได้จำนวน 7 โคโลนีมาศึกษาการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ (รูปที่ 6) พบว่ายีสต์กลายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ส่วนใหญ่มีการเจริญเติบโตให้มวลสูงกว่าสายพันธุ์เดิมอย่างเห็นได้ชัด รวมทั้งสายพันธุ์ GETH1 ซึ่งได้จากการกลายพันธุ์ด้วยการบ่มกับ EMS ซ้ำๆอย่างต่อเนื่อง 2 ครั้งกับ GES11 โดยผ่านการเลี้ยงข้ามคืนแล้วกลายพันธุ์ซ้ำทันที และ สายพันธุ์ GETH2 และ GETH3 ที่ทำในลักษณะเดียวกันกับ GES6 เมื่อพิจารณาค่าปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อยีสต์พบว่าสายพันธุ์คัดเลือกที่ได้มีปริมาณการผลิตแคโรทีนอยด์ลดลงจากสายพันธุ์เดิมเล็กน้อย แต่เมื่อเทียบกับ GM807 พบว่า GET10, GET7 GETH1 สามารถผลิตแคโรทีนอยด์เพิ่มจาก GM807 เป็น 1.34, 1.46 และ 1.29 เท่าตามลำดับ ดังนั้น การกลายพันธุ์ที่ทำใน

งานวิจัยนี้พบว่า การกลายพันธุ์ 3-4 ครั้งไม่ได้ทำให้ได้สายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ผลิตแคโรทีนอยด์สูงมากนัก ในขณะที่ส่วนใหญ่มีการเจริญเติบโตให้มวลสูงกว่าสายพันธุ์เดิม



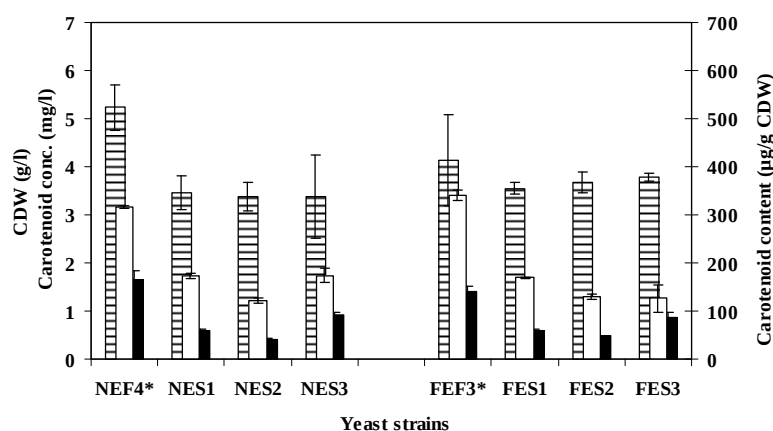
รูปที่ 6 ความสามารถเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์ดั้งเดิม (*) และยีสต์ที่ผ่านการกลายพันธุ์ซ้ำด้วย EMS ที่ 8 % (v/v) โดย $\blacksquare$ เป็นน้ำหนักเซลล์แห้ง (g/l) $\blacksquare$ เป็นความเข้มข้นแคโรทีนอยด์ (mg/l) $\square$ เป็นปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อน้ำหนักยีสต์ ($\mu\text{g/g}$)



รูปที่ 7 ความสามารถเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์ N78 และ FN99 และสายพันธุ์ที่ผ่านการกลายพันธุ์ซ้ำด้วย EMS ที่ 2 % (v/v) โดย $\blacksquare$ เป็นน้ำหนักเซลล์แห้ง (g/l) $\blacksquare$ เป็นความเข้มข้นแคโรทีนอยด์ (mg/l) $\square$ เป็นปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อน้ำหนักยีสต์ ($\mu\text{g/g}$)

ส่วนการคัดเลือกสายพันธุ์กลายพันธุ์จาก FN99 และ N78 ทำในทำนองเดียวกันโดยคัดเลือกยีสต์กลายพันธุ์มาสายพันธุ์ละ 5 โคลนี มาศึกษาการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ และนำไปถ่ายเลี้ยงต่อในอาหาร YM พบว่ามีบางสายพันธุ์ที่มีการเจริญโดยไม่ผลิตสี หรือมีสีส้มอ่อนและเหลือง ยกเว้นสายพันธุ์ NEF4 และ FEF3 ที่มีสีส้มเข้มมีการเจริญดี และ/หรือให้ผลการผลิตแคโรทีนอยด์ดีดังแสดงในรูปที่ 7 จึงนำเชื้อทั้งสองสายพันธุ์มาทำการกลายพันธุ์ซ้ำต่อไป ซึ่งให้ผลดังแสดงในรูปที่ 8 ที่พบว่า การกลาย

พันธุ์ครั้งที่สอง กลับให้ปริมาณการสร้างแคโรทีนอยด์ในยีสต์ลดลง ดังนั้นจึงไม่นำสายพันธุ์กลายพันธุ์ดังกล่าวมาตรวจวิเคราะห์หาปริมาณแคโรทีนอยด์อีกต่อไป

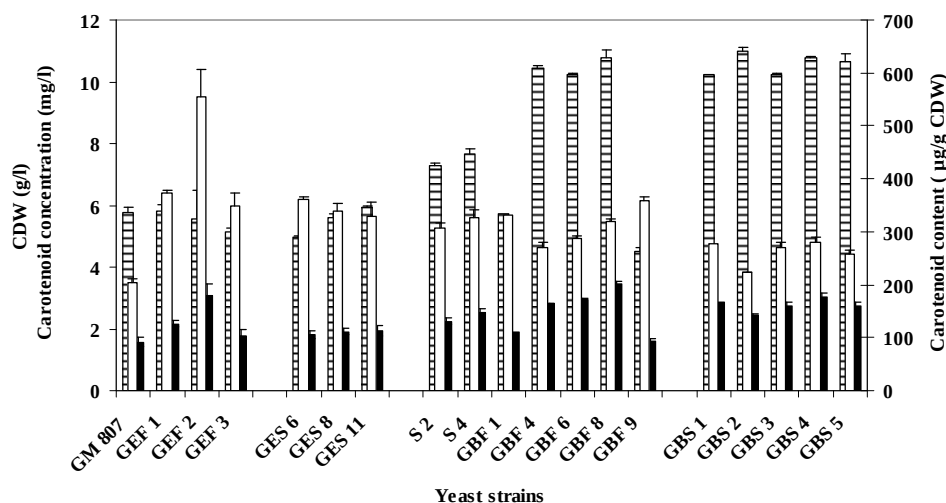


รูปที่ 8 ความสามารถเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์จากยีสต์ดั้งเดิม NEF4, FEF3 และสายพันธุ์ที่ผ่านการกลายพันธุ์ซ้ำด้วย EMS ที่ 5 % (v/v) โดย เป็นน้ำหนักเซลล์แห้ง (g/l) เป็นความเข้มข้นแคโรทีนอยด์ (mg/l) เป็นปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อน้ำหนักยีสต์ (µg/g)

1.1.3 การคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์กลายพันธุ์ด้วย β -ionone

การปรับปรุงขั้นตอนการคัดเลือกสายพันธุ์กลายพันธุ์โดยใช้ β -ionone พบว่าทำให้โคโลนีของยีสต์มีสีซีดลงกว่าสถานะที่ไม่มี β -ionone เนื่องจาก β -ionone เป็น ring analog ของ β -carotene ที่ยับยั้งการผลิตแอสตาแซนทินในยีสต์ที่ระดับของ β -carotene ได้ (Lewis et al., 1990) ดังนั้นยีสต์ที่ผลิตแอสตาแซนทินได้มากก็จะมีสีเข้มกว่า ในขณะที่ยีสต์ที่ผลิตแอสตาแซนทินได้น้อยจะมีสีซีดหรือสีเหลือง วิธีการคัดเลือกโดยใช้ β -ionone จึงเป็นการช่วยให้การคัดเลือกยีสต์ทำได้ง่ายขึ้น ซึ่งวิธีการคัดเลือกดังกล่าว ได้สายพันธุ์ส่วนใหญ่ที่เจริญได้ดีขึ้นดังแสดงในรูปที่ 9 แต่ความสามารถผลิตแคโรทีนอยด์พบว่าไม่แน่นอน โดยมีทั้งที่ผลิตได้เพิ่มขึ้นและลดลง และพบว่าสายพันธุ์ GBF8 เป็นสายพันธุ์ที่มีแนวโน้มดีเมื่อเทียบกับ GM807 ซึ่งให้การผลิตแคโรทีนอยด์ ($\mu\text{g/g}$) และการเจริญ (g/l) เพิ่มขึ้นเป็น 1.57 และ 1.87 เท่าตามลำดับ และจะมีผลให้มีปริมาตรการผลิตแคโรทีนอยด์ (mg/l) เพิ่มขึ้นเป็น 2.2 เท่ามากกว่า GM807 ดังนั้น โดยสรุปในการศึกษานี้พบว่า การกลายพันธุ์ซ้ำ ด้วย EMS ที่ความเข้มข้นมากขึ้นไม่ได้ทำให้สายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ได้มีปริมาณการผลิตแคโรทีนอยด์สูงขึ้นมากนัก แต่กลับทำให้มีการเจริญเพิ่มขึ้น โดยสารกลายพันธุ์ EMS อาจไม่มีประสิทธิภาพให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ดี และอาจเป็นเพียงสารที่กระตุ้นให้เกิดการเจริญมากขึ้นหลังก่อภาวะเครียดกับเซลล์ให้เซลล์ซ่อมแซมตัวเอง หรือการที่ไม่ได้สายพันธุ์ที่ผลิตแคโรทีนอยด์สูงขึ้นในงานวิจัยนี้ อาจเกิดจากข้อจำกัดของสายพันธุ์ยีสต์เริ่มต้นเอง เนื่องจากพบว่าสายพันธุ์ N78 และ FN99 เมื่อนำไปกลายพันธุ์ซ้ำด้วย EMS ในครั้งที่สองทำให้ยีสต์ผลิตแคโรทีนอยด์ได้ลดลงและให้สีโคโลนีเป็นสีเหลืองและขาวเพิ่มขึ้น แต่การได้ยีสต์กลายพันธุ์ที่ดีกว่าจาก

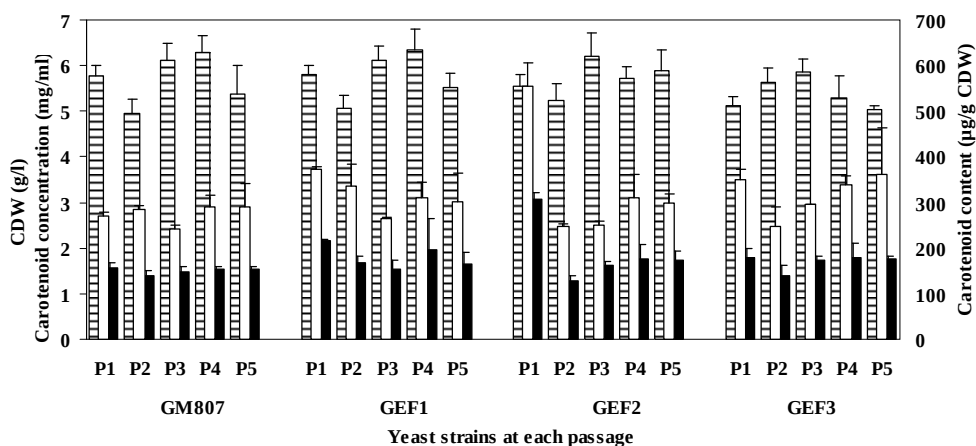
สายพันธุ์ GM807 อาจเกิดจาก EMS ไปช่วยเพิ่มเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของยีสต์ให้เห็นเด่นชัด และอาจมีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอื่นที่เกี่ยวข้องกับวิธีการสร้างแคโรทีนอยด์ ซึ่งจะต้องวิเคราะห์ ปริมาณสัดส่วนและชนิดต่างๆของแคโรทีนอยด์ที่ผลิตได้จากยีสต์ต่อไป



รูปที่ 9 ความสามารถเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์จากยีสต์ดั้งเดิม GM807 และสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่คัดเลือกบน β -ionone โดย เป็นน้ำหนักเซลล์แห้ง (g/l) เป็นความเข้มข้นแคโรทีนอยด์ (mg/l) เป็นปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อน้ำหนักยีสต์ (μ g/g)

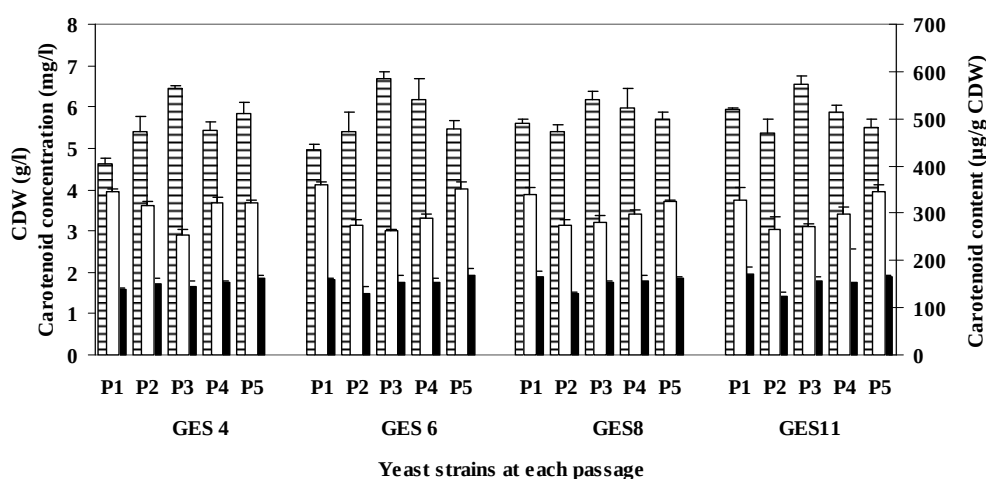
1.1.4 การคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์กลายพันธุ์ที่สามารถผลิตแอสตาแซนทินได้คงที่

การศึกษาความเสถียรของ GM807 และสายพันธุ์คัดเลือกที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วย EMS ในแต่ละรุ่นพบว่าสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้จากรุ่นที่ 1 คือสายพันธุ์ GEF1, GEF2 และ GEF3 ให้ผลการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ในระยะเวลาการถ่ายเลี้ยงทั้ง 5 รุ่นแสดงในรูปที่ 10 ซึ่งพบว่า GEF3 มีการเจริญลดลง ในขณะที่สายพันธุ์ GEF1 และ GEF2 มีการเจริญสูงกว่า อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาความสามารถในการสร้างแคโรทีนอยด์ของยีสต์สายพันธุ์ดังกล่าว พบว่า GM807 มีการผลิตที่ไม่คงที่ใน 5 รุ่นของการถ่ายเลี้ยง ขณะที่สายพันธุ์ GEF1 แม้มีแนวโน้มที่ผลิตแคโรทีนอยด์ลดลงเมื่อถ่ายเลี้ยงมากขึ้น แต่ก็ให้ปริมาณการผลิตสูงกว่า GM807 ส่วน GEF2 และ GEF3 มีการผลิตลดลงอย่างชัดเจนในรุ่นที่ 2 แต่หลังจากนั้นการผลิตจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นเล็กน้อย ดังนั้นการกลายพันธุ์ครั้งแรกด้วย EMS ให้สายพันธุ์กลายพันธุ์ที่มีแนวโน้มของการผลิตแคโรทีนอยด์เฉลี่ยใน 5 รุ่นของการถ่ายเลี้ยงของ GEF1, GEF2 และ GEF3 สูงกว่าสายพันธุ์เดิมคือ GM807 เพียงเล็กน้อย



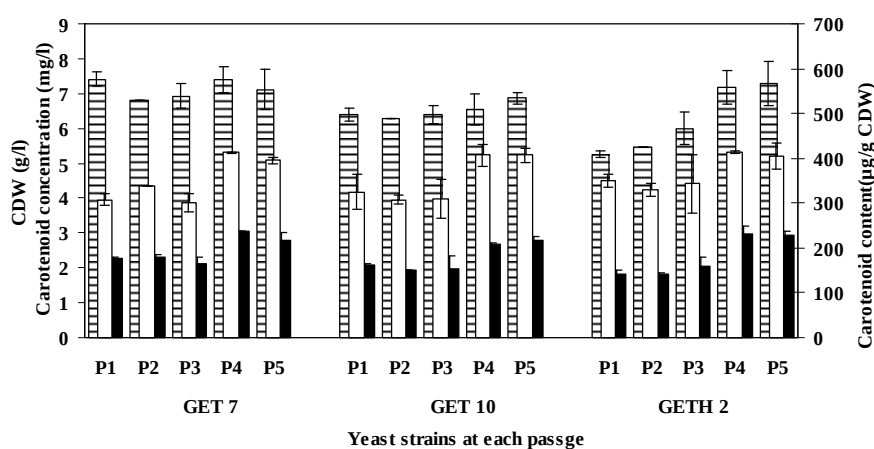
รูปที่ 10 การเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์จากยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิม GM807 และสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่รุ่นต่างๆของการถ่ายเลี้ยง โดย ▨ เป็นน้ำหนักเซลล์แห้ง (g/l) ■ เป็นความเข้มข้นแคโรทีนอยด์ (mg/l) และ □ เป็นปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อน้ำหนักยีสต์ (µg/g), P1, 2, 3, 4 และ 5 แสดงรุ่นต่างๆ ของการถ่ายเลี้ยง

ในการศึกษาความเสถียรของสายพันธุ์ที่คัดเลือกจากการกลายพันธุ์ด้วย EMS ครั้งที่ 2 คือสายพันธุ์ GES4, GES6, GES8 และ GES11 ที่ระยะเวลาการถ่ายเลี้ยงทั้ง 5 รุ่นได้ผลแสดงในรูปที่ 11 ซึ่งพบว่าแต่ละสายพันธุ์ค่อนข้างจะมีการเจริญที่ไม่คงที่ แต่มีแนวโน้มที่ดีคือมีการเจริญที่ไม่ต่ำกว่าในรุ่นแรกและมีการเจริญให้มวลมากกว่า GM807 เมื่อพิจารณาความสามารถในการสร้างแคโรทีนอยด์ของยีสต์กลุ่มนี้ พบว่าการผลิตแคโรทีนอยด์มีแนวโน้มในทางเดียวกันคือมีการผลิตได้ไม่คงที่ในแต่ละรุ่นของการถ่ายเลี้ยง และให้ปริมาณการผลิตสูงกว่า GM807 เล็กน้อย



รูปที่ 11 ความสามารถเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์จากยีสต์สายพันธุ์กลายพันธุ์ (GES 4, 6, 8, 11) ที่รุ่นต่างๆของการถ่ายเลี้ยง โดย ▨ เป็นน้ำหนักเซลล์แห้ง (g/l) ■ เป็นความเข้มข้นแคโรทีนอยด์ (mg/l) □ เป็นปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อน้ำหนักยีสต์ (µg/g), P1, 2, 3, 4 และ 5 แสดงรุ่นต่างๆ ของการถ่ายเลี้ยง

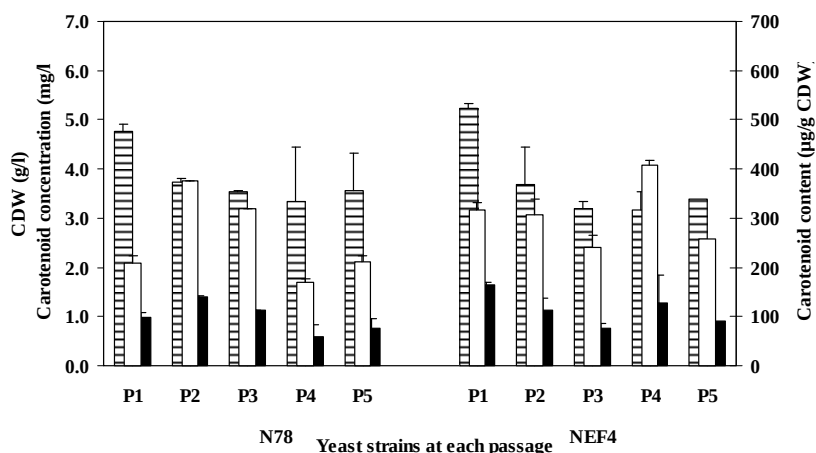
การศึกษาความเสถียรของสายพันธุ์ยีสต์ GET 7, GET 10 และ GETH2 ที่ผ่านการกลายพันธุ์ซ้ำ 3 ครั้ง แสดงในรูปที่ 12 พบว่ายีสต์มีการเจริญให้มวลมากขึ้นและมากกว่า GM807 ประมาณ 1.1-1.4 เท่า โดย GET 7 และ GET 10 มีความสามารถเจริญสม่ำเสมอในแต่ละรุ่นของการถ่ายเลี้ยงมากกว่า GETH2 ส่วนการผลิตแคโรทีนอยด์พบว่าเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์มีการผลิตแคโรทีนอยด์สูงกว่า GM807 ไม่แตกต่างกันมากนัก ดังนั้น การกลายพันธุ์ซ้ำๆ สามารถได้สายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ผลิตแคโรทีนอยด์สูงขึ้นไม่มากนัก โดยสายพันธุ์ดังกล่าวมีความสามารถเจริญให้มวลมากขึ้น แล้วมีผลให้มีปริมาณการผลิตแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้น



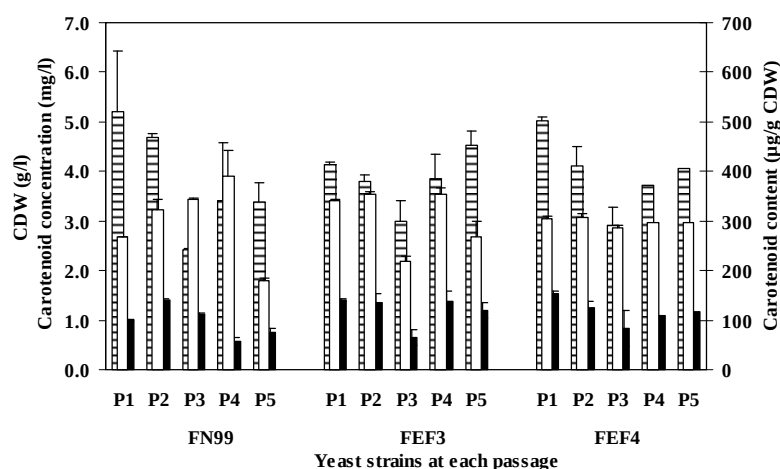
รูปที่ 12 ความสามารถเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์จากยีสต์สายพันธุ์กลายพันธุ์ (GET 7, 10, GETH 2) ที่รุ่นต่างๆ ของการถ่ายเลี้ยง โดย ■ เป็นน้ำหนักเซลล์แห้ง (g/l) ■ เป็นความเข้มข้นแคโรทีนอยด์ (mg/l) □ เป็นปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อน้ำหนักยีสต์ (μg/g), P1, 2, 3, 4 และ 5 แสดงรุ่นต่างๆ ของการถ่ายเลี้ยง

ส่วนการศึกษาความเสถียรของ N78 และ NEF4 (รูปที่ 13) พบว่า สายพันธุ์ทั้งสองมีการเจริญลดลง และค่อนข้างคงที่ในระยะของการถ่ายเลี้ยงรุ่นที่ 3-5 โดยความสามารถผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์ทั้งสองมีปริมาณการผลิตค่อนข้างไม่คงที่เช่นกันในแต่ละรุ่นของการถ่ายเลี้ยง อย่างไรก็ตาม ยีสต์กลายพันธุ์ NEF4 ให้ภาพรวมแนวโน้มการผลิตแคโรทีนอยด์สูงกว่า N78 ประมาณ 1.3-1.4 เท่า ขณะที่สายพันธุ์กลายพันธุ์ FEF3 และ FEF4 มีการเจริญให้มวลไม่คงที่เช่นกันในการถ่ายเลี้ยงแต่ละครั้ง (รูปที่ 14) อย่างไรก็ตามสายพันธุ์ FEF3 และ FEF4 ที่ได้มีแนวโน้มของอัตราการเจริญดีกว่า FN99 ขณะที่ความสามารถผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์พบว่า FN99 และ FEF3 มีปริมาณการผลิตที่ไม่คงที่ในแต่ละรุ่นของการถ่ายเลี้ยง โดยยีสต์กลายพันธุ์ FEF4 มีแนวโน้มให้การผลิตดีกว่าซึ่งให้ปริมาณการผลิตค่อนข้างคงที่กว่า และให้ปริมาณแคโรทีนอยด์สูงกว่า FN99 1.15 เท่า ดังนั้นการกลายพันธุ์ N78 และ FN99 ด้วย

EMS หนึ่งครั้ง สามารถให้ปริมาณการผลิตแคโรทีนอยด์สูงขึ้นได้ในลักษณะใกล้เคียงกับสายพันธุ์ กลายพันธุ์จาก GM807



รูปที่ 13 ความสามารถเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์จากยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิม N78 และ NEF4 ที่รุ่นต่างๆ ของการถ่ายเลี้ยง โดย ▨ เป็นน้ำหนักเซลล์แห้ง (g/l) ■ เป็นความเข้มข้นแคโรทีนอยด์ (mg/l) □ เป็นปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อน้ำหนักยีสต์ (µg/g)



รูปที่ 14 ความสามารถเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์จากยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิม FN99 และสายพันธุ์กลายพันธุ์ FEF3 และ FEF4 ที่รุ่นการถ่ายเลี้ยงต่างๆ โดย ▨ เป็นน้ำหนักเซลล์แห้ง (g/l) ■ เป็นความเข้มข้นแคโรทีนอยด์ (mg/l) □ เป็นปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อน้ำหนักยีสต์ (µg/g)

เมื่อพิจารณาโดยรวมถึงความเสถียรของยีสต์ในการผลิตแคโรทีนอยด์ระหว่างการถ่ายเลี้ยง 5 รุ่น พบว่า สายพันธุ์ทั้งหมดที่คัดเลือกได้มีการผลิตแคโรทีนอยด์และการเจริญได้ไม่คงที่ในแต่ละรุ่นในลักษณะใกล้เคียงกับสายพันธุ์ดั้งเดิม อย่างไรก็ตามการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ในสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่คัดเลือกในอาหารที่มี β -ionone จะค่อนข้างคงที่ เมื่อทำการถ่ายเลี้ยงซ้ำๆ โดยเฉพาะสาย

พันธุ์ GBF8 และ GBF9 จึงนำไปศึกษาหาอาหารที่เหมาะสมจากวัสดุทางการเกษตรและสภาวะการเจริญที่สามารถให้การเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์ได้ดีที่สุดต่อไป

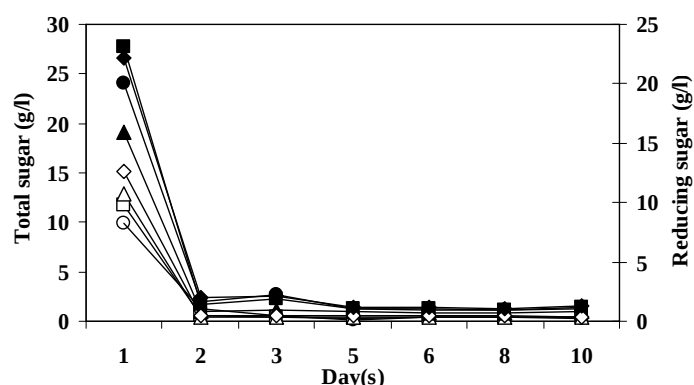
1.1.5 ปริมาณแอสตาแซนทีนที่ผลิตได้จากยีสต์กลายพันธุ์

การวิเคราะห์หาปริมาณแอสตาแซนทีนด้วย HPLC เทียบกับแอสตาแซนทีนบริสุทธิ์พบ peak ของสารละลายแอสตาแซนทีนออกมากับการชะด้วย Dichloromethan : Methanol (25:75) ซึ่งเมื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณเปอร์เซ็นต์แอสตาแซนทีนจากแคโรทีนอยด์ทั้งหมดที่ยีสต์สร้างพบว่าสายพันธุ์ต่างๆ ที่คัดเลือกไว้ของ GBF8, S4 และ GBF9 มีปริมาณการผลิตแอสตาแซนทีนสูงกว่า GM807 ประมาณ 1.4-1.6 เท่า แสดงว่า EMS สามารถทำให้ยีสต์กลายพันธุ์สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ที่มีสัดส่วนของแอสตาแซนทีนสูงขึ้น

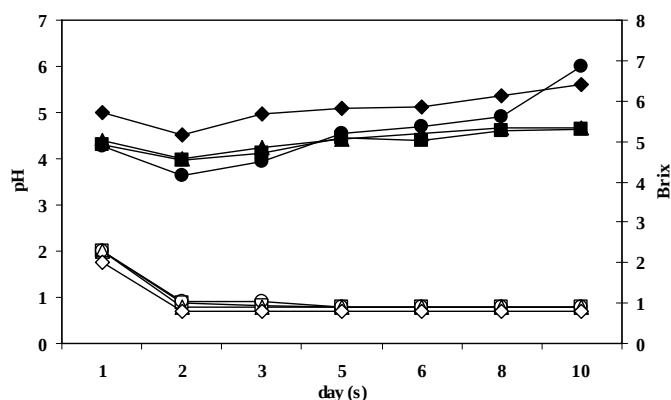
1.2 การลดต้นทุนการผลิตโดยใช้วัสดุราคาถูกจากการเกษตรเป็นอาหารเลี้ยงยีสต์

1.2.1 รูปแบบการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์ดั้งเดิมและยีสต์กลายพันธุ์

การศึกษาความสัมพันธ์ของการเจริญของยีสต์ดั้งเดิมและยีสต์กลายพันธุ์ในอาหาร YM เป็นระยะเวลา 10 วัน พบว่ายีสต์กลายพันธุ์และยีสต์ดั้งเดิมสามารถเจริญและใช้น้ำตาลทั้ง reducing sugar และ total sugar อย่างรวดเร็วจากค่าของ reducing sugar เริ่มต้น 15 g/l และ total sugar เริ่มต้น 20-23.5 g/l ลดลงภายในเวลา 2 วัน ในทุกสายพันธุ์ (รูปที่ 15) ซึ่งสอดคล้องในทำนองเดียวกันกับค่า Brix ที่มีการลดลงจาก 2 เป็น 0.8 โดยยีสต์ทั้งหมดสามารถเจริญใน YM และทำให้ pH ลดลงเล็กน้อยในวันที่สอง ซึ่งอาจเป็นผลจากการผลิตกรดจากน้ำตาลที่ใช้ ทำให้ pH ของอาหารเริ่มต้นลดลงเล็กน้อยก่อนค่อยๆ เพิ่มความเป็นด่างมากขึ้น โดย GBF8 มีความเป็นด่างสูงสุดในวันที่ 10 (รูปที่ 16)



รูปที่ 15 การเปลี่ยนแปลงของ reducing sugar (สัญลักษณ์เปิด) และ Total sugar (สัญลักษณ์ปิด) ในระหว่างการเลี้ยงยีสต์ GM807 (□) และสายพันธุ์กลายพันธุ์ GBF8 (●) GBF9 (◇) และ S4 (▲) ในอาหาร YM เป็นระยะเวลา 10 วัน

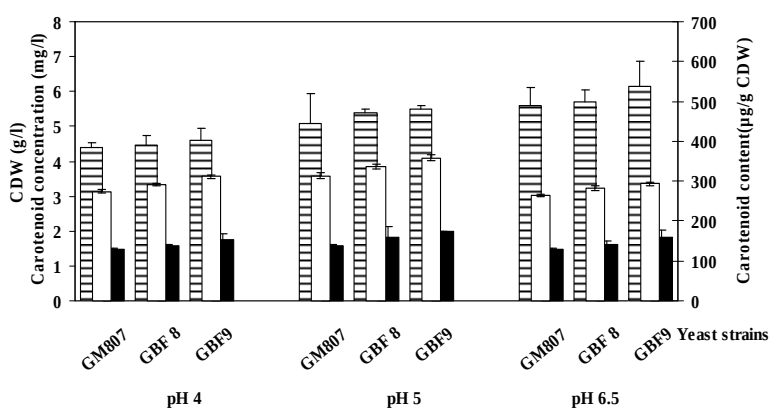


รูปที่ 16 การเปลี่ยนแปลงของ pH (สัญลักษณ์ปิด) และ Brix (สัญลักษณ์เปิด) ในระหว่างการเลี้ยงยีสต์ GM807 (□) และสายพันธุ์กลายพันธุ์ GBF8 (⊕) GBF9 (◇) และ S4 (△) ในอาหาร YM เป็นระยะเวลา 10 วัน

การศึกษาความสัมพันธ์ของการเจริญต่อการผลิตแคโรทีนอยด์พบว่า ยีสต์ทั้งสี่สายพันธุ์มีการเจริญอย่างรวดเร็วในวันที่สอง ซึ่งสัมพันธ์กับการใช้น้ำตาล หลังจากนั้นจะมีการเจริญให้มวลค่อนข้างคงที่ โดยทั้งสี่สายพันธุ์มีการเจริญให้มวลในช่วงใกล้เคียงกัน ส่วนการผลิตแคโรทีนอยด์พบว่ายีสต์มีการผลิตแคโรทีนอยด์ระหว่างการเจริญ โดยค่อยๆ เพิ่มขึ้นตามเวลาและให้แคโรทีนอยด์สูงสุดในวันที่ 6 ซึ่งแคโรทีนอยด์จาก GBF8 และ GBF9 จะมีปริมาณมากกว่า GM807 และ S4 ดังนั้น GBF8 และ GBF9 ที่สามารถเจริญได้ดีและให้แคโรทีนอยด์ต่อน้ำหนักยีสต์สูงกว่า GM807 จึงเป็นยีสต์ที่เหมาะสมต่อการนำไปศึกษาเพื่อปรับปรุงการผลิตแคโรทีนอยด์ต่อไป

1.2.2 ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์

การศึกษา pH ที่เหมาะต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์ดั้งเดิมและยีสต์กลายพันธุ์พบว่ายีสต์ทั้งหมดมีรูปแบบที่ตอบสนองต่อ pH เหมือนกัน ดังแสดงในรูปที่ 17



รูปที่ 17 การเจริญ (■) และการผลิตแคโรทีนอยด์ต่อน้ำหนักยีสต์ (□) ของยีสต์ GM807, GBF8 และ GBF9 ในอาหาร YM ที่ pH 4, 5 และ 6.5 เป็นระยะเวลา 5 วัน

ยีสต์ทุกสายพันธุ์สามารถเจริญให้มวลดีที่ pH 6.5 โดย GBF9 เจริญให้มวลสูงกว่า GBF8 และ GM807 เล็กน้อย ขณะที่ pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตแคโรทีนอยด์อยู่ที่ pH 5 โดย GBF9 สามารถให้ปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อน้ำหนักยีสต์สูงที่สุด

1.2.3 การศึกษาชนิดของสารอาหารจากวัสดุทางการเกษตรกับการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์ดั้งเดิมและยีสต์กลายพันธุ์ที่คัดเลือก

Phaffia rhodozyma มีความสามารถใช้น้ำตาลได้หลายชนิดจากการศึกษาของ Sun et al (2004) ทำให้สามารถใช้สารอาหารน้ำตาลจากวัสดุทางการเกษตรหลากหลายชนิดในการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์ เช่น น้ำอ้อย (FloreÁncio et al. 1998) น้ำมะพร้าว (Domínguez-Bocanegra and Torres-Muñoz 2004) และน้ำสับปะรด (Jirasripongpun et al. 2008) ในที่นี้มีวัตถุประสงค์เปรียบเทียบน้ำทั้งสามเพื่อหาน้ำที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์ของสายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ โดยศึกษาสมบัติของน้ำสับปะรด น้ำมะพร้าว และน้ำอ้อย ที่เกี่ยวกับความเป็นกรดต่าง ปริมาณน้ำตาล และไนโตรเจนของน้ำแต่ละชนิด พบว่า น้ำต่างๆ ที่นำมาศึกษามีองค์ประกอบของสารอาหารที่เป็นไนโตรเจน และน้ำตาลที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน และมีค่าความเป็นกรดต่างไปทางกรดซึ่งเหมาะสมต่อการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์ของ *Phaffia rhodozyma* การใช้น้ำเหล่านั้นเป็นอาหารที่ระดับค่าการเจือจางค่าหนึ่งด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Potassium hydrogen phthalate ที่ pH 5 และควบคุมระดับน้ำตาล (Reducing sugar) ให้ได้ 15 g/l แล้วนำไปเลี้ยงยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ ที่สถานะเดิม พบว่าน้ำผลไม้ชนิดต่างๆ สามารถให้ยีสต์แต่ละสายพันธุ์เจริญได้ดีและให้มวลได้มากกว่าอาหาร YM โดยยีสต์ส่วนใหญ่ยกเว้น S4 จะเจริญในน้ำสับปะรดได้ดีกว่าน้ำมะพร้าว น้ำอ้อย และ YM ตามลำดับ อาจเนื่องมาจากในน้ำเหล่านั้นมีสารอาหารบางชนิดที่เหมาะสมต่อการเจริญมากกว่า YM อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อน้ำหนักยีสต์พบว่ายีสต์ที่เจริญใน YM มีปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อน้ำหนักยีสต์สูงที่สุด และมากกว่าน้ำสับปะรด น้ำมะพร้าว และน้ำอ้อยตามลำดับ ในทุกๆ สายพันธุ์ของยีสต์ที่ศึกษา อาจเป็นไปได้ว่าสัดส่วนของปริมาณน้ำตาลและไนโตรเจนอาจมีผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ต่อน้ำหนักยีสต์ได้ อย่างไรก็ตามสายพันธุ์ GBF8 และ GBF9 มีความสามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้ดีกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม GM807 ในทุกชนิดอาหาร ซึ่งเป็นข้อมูลเสริมที่ยืนยันได้ว่า แม้การกลายพันธุ์ GM807 ด้วย EMS จะสามารถให้สายพันธุ์ที่ผลิตแคโรทีนอยด์ต่อน้ำหนักยีสต์ได้เพิ่มขึ้นได้ไม่มากนัก แต่การเลือกใช้สารอาหารที่เหมาะสมก็สามารถเพิ่มปริมาณการผลิตแคโรทีนอยด์จากยีสต์ให้สูงขึ้นได้

นอกจากนี้ได้ศึกษาปริมาณการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์ในน้ำผลไม้ที่มีระดับความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากันที่ 10 g/l พบว่ายีสต์สายพันธุ์ต่างๆ ที่ศึกษามีการผลิตแคโรทีนอยด์ในยีสต์ (การผลิตแคโรทีนอยด์ต่อน้ำหนักยีสต์) ที่ไม่สัมพันธ์กับการเจริญของยีสต์ โดยมวลที่มากขึ้นไม่ได้ทำให้ได้ปริมาณแคโรทีนอยด์ในเซลล์มากขึ้นเสมอไป และจากสายพันธุ์ทั้งหมดที่ศึกษา GBF9 สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้ดีที่สุดในอาหาร YM เมื่อเทียบกับสายพันธุ์อื่นๆ ส่วนการผลิตแคโร

ทีนอยด์ของยีสต์สายพันธุ์ต่างๆเมื่อเจริญในน้ำผลไม้ต่างๆ พบว่า GBF8 จะผลิตแคโรทีนอยด์ได้ดีที่สุดที่ระดับน้ำตาลเริ่มต้น 15 g/l แต่ GBF9 จะผลิตแคโรทีนอยด์ได้ดีที่สุดที่ระดับน้ำตาลเริ่มต้น 10 g/l ดังนั้น GBF9 จึงเป็นสายพันธุ์ที่น่าจะเหมาะสมที่สุดในการนำมาผลิตแคโรทีนอยด์ เนื่องจากสามารถเจริญได้ดีในน้ำผลไม้หลากหลายชนิด มีความต้องการสารอาหารในระดับที่น้อยกว่า ในขณะที่สามารถให้ปริมาณการผลิตแคโรทีนอยด์ได้ใกล้เคียงกัน

1.2.4 แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์

การศึกษาลำโพงไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์ ซึ่งได้ทำการทดลองใน minimal basal medium (MBM) ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 20 g/l และพบว่า Beef extract ที่ความเข้มข้น 1g/l สามารถทำให้ GM807 เจริญและผลิตแคโรทีนอยด์ได้ค่อนข้างดีเมื่อเทียบกับ YM และดีกว่าไนโตรเจนแหล่งอื่นๆ ส่วนยีสต์สายพันธุ์ GBF9 เจริญและผลิตแคโรทีนอยด์ได้ค่อนข้างดีกว่าเมื่อแหล่งไนโตรเจนเป็นยูเรียที่ความเข้มข้น 1g/l ซึ่งถือเป็นข้อดีที่ GBF9 ใช้แหล่งไนโตรเจนราคาถูกของยูเรียได้ และอาจทำให้ต้นทุนการผลิตลดลงได้ดีกว่าการเสริมด้วย beef extract สำหรับการเลี้ยงเชื้อดั้งเดิมของ GM807

1.2.5 สัดส่วนของคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์

การปรับระดับน้ำตาล Reducing sugar และไนโตรเจน เพื่อให้ได้อาหารที่มีสัดส่วนของคาร์บอนและไนโตรเจน (C:N) ต่างกัน พบว่าทั้ง GM807 และ GBF9 สามารถเจริญให้มวลได้ดีเมื่อมี C:N เป็น 35.6 ขึ้นไป แต่การผลิตแคโรทีนอยด์ในอาหารที่มี C:N ต่ำกว่า 35.6 พบว่ายีสต์มีแนวโน้มให้ปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อน้ำหนักยีสต์เพิ่มขึ้น และเห็นผลได้ค่อนข้างชัดใน GBF9 ที่ระดับ C:N เป็น 24.4

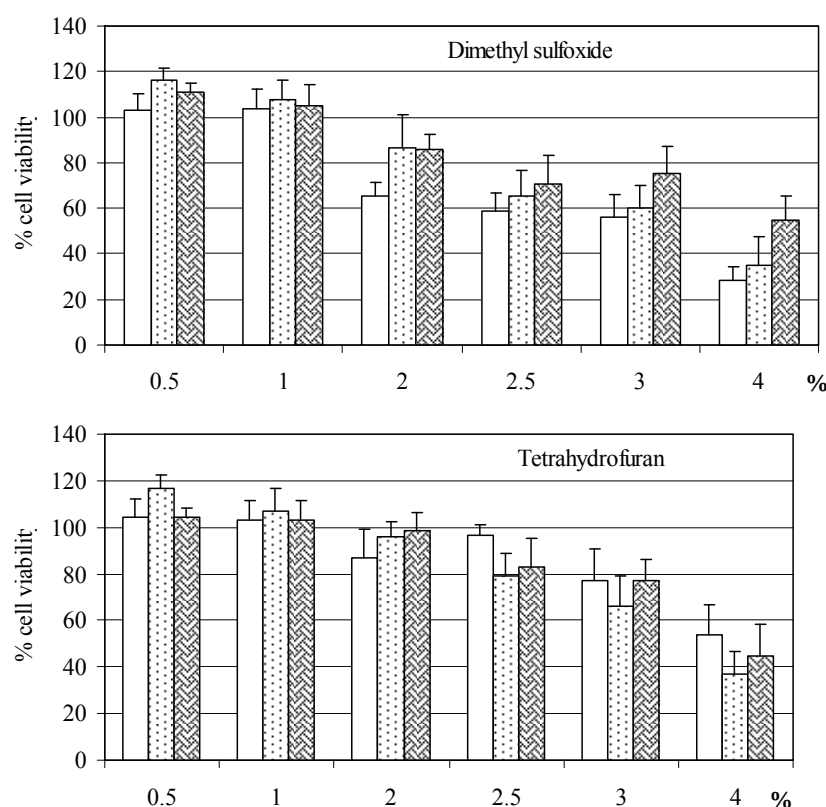
ส่วนที่ 2 การตรวจสอบคุณสมบัติต่างๆ ของแอสตาแซนทินจากยีสต์

2.1 การศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสมและการตรวจสอบความเป็นพิษของตัวทำละลาย

การทดสอบเบื้องต้นเพื่อศึกษาความสามารถในการละลายแอสตาแซนทินที่สกัดได้จากยีสต์ และ β -carotene ในตัวทำละลายชนิดต่างๆ ก่อนนำไปใช้ในการศึกษาคุณสมบัติของแอสตาแซนทินกับเซลล์ไลน์ โดยแอสตาแซนทินเป็นสารในกลุ่มของแคโรทีนอยด์ที่มีความสามารถในการละลายในไขมันได้ดี แต่ละลายได้ไม่ดีในน้ำ ซึ่งมีผลให้เซลล์ไม่ได้สัมผัสกับแอสตาแซนทินโดยตรง แล้วทำให้ไม่มีผลกระทบต่อการศึกษาคุณสมบัติของแอสตาแซนทินอย่างแท้จริง ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาลำโพงตัวทำละลายที่เหมาะสมและไม่เป็นพิษต่อเซลล์ก่อน ซึ่งผลจากการทดสอบความสามารถใน

การละลายในตัวทำละลายของ Dimethyl sulfoxide (DMSO), Ethyl acetate, Tetrahydrofuran (THF), Dichloromethane: methanol พบว่าตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับแอสตาแซนทินคือสารละลาย DMSO และสำหรับ β -carotene คือสารละลาย THF

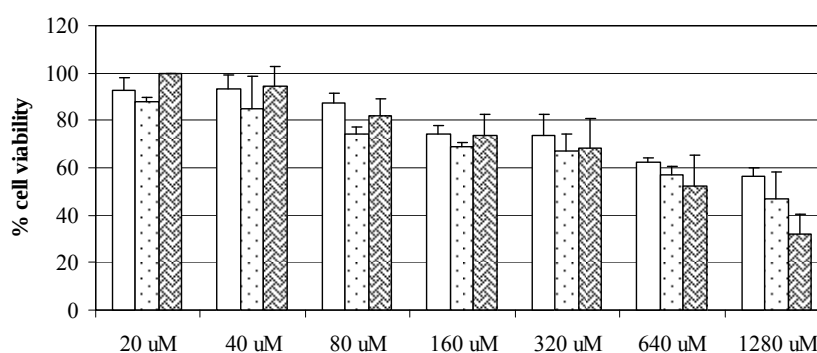
การทดสอบความเป็นพิษของตัวทำละลาย DMSO และ THF ต่อความมีชีวิตของเซลล์แต่ละชนิด ด้วยการใส่สารละลายที่ความเข้มข้น 0.5 - 4% (v/v) ในอาหารเลี้ยงเซลล์หลังจากบ่มเลี้ยงเซลล์ให้เจริญอยู่ใน log phase บ่มเซลล์กับสารทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้ววิเคราะห์ความมีชีวิตของเซลล์โดย MTT assay ที่อาศัยหลักการของเอนไซม์ succinate dehydrogenase ใน mitochondria ของเซลล์ที่มีชีวิตไปทำปฏิกิริยากับ 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) ให้ได้เป็น formazan product ซึ่งมีสีม่วงเข้ม ที่สามารถตรวจวัดปริมาณค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm ได้ ซึ่งได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 18 พบว่าตัวทำละลายทั้งสองชนิดมีความเป็นพิษต่อเซลล์โดยแปรผันตรงตามความเข้มข้นของตัวทำละลาย อย่างไรก็ตามจะเห็นว่าสารละลายทั้งสองชนิดสามารถนำมาใช้ในการเป็นตัวทำละลายตัวอย่างที่ทดสอบได้ในระดับที่ไม่เป็นพิษที่ความเข้มข้นไม่เกิน 1% สำหรับเซลล์ไลน์ทั้ง 3 ชนิดคือ Vero, Hela และ HepG2



รูปที่ 18 เปอร์เซนต์ความมีชีวิตของเซลล์ที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ (v/v) ของตัวทำละลาย Dimethyl sulfoxide (รูปบน) และ Tetrahydrofuran (รูปล่าง) ในเซลล์ไลน์ Vero ($\square$), Hela ($\square$) และ HepG2 ($\square$)

2.2 การศึกษาความเป็นพิษของสารกระตุ้น *tert*-butyl hydroperoxide (t-BHP)

ในกรณีที่ต้องการศึกษาผลการบรรเทาของแอสตาแซนทินต่อภาวะเครียดที่เกิดจาก t-BHP มีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาความเป็นพิษของ t-BHP ที่ใช้เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดภาวะเครียด เพื่อหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ทำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน โดยไม่มีผลกระทบต่อความมีชีวิตของเซลล์มากเกินไป เพื่อใช้ในการศึกษากับแอสตาแซนทิน โดยทำการทดลองในลักษณะเดียวกันกับ 2.1 ด้วยการบ่มเซลล์กับ t-BHP ที่ระดับความเข้มข้น 20-1280 μM เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ซึ่งได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 19 จะเห็นได้ว่าความมีชีวิตของเซลล์ลดลงเมื่อความเข้มข้นของสาร t-BHP เพิ่มขึ้นตามลำดับ โดยค่า IC_{50} (50% inhibition concentration) ของเซลล์ทั้ง 3 ชนิดอยู่ในช่วง 600-800 μM และมีค่า IC_{20} อยู่ในช่วง 100-200 μM ซึ่งสามารถนำไปเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการศึกษาผลของแอสตาแซนทินในการบรรเทาภาวะเครียดออกซิเดชันของสารกระตุ้นชนิดนี้ต่อไป



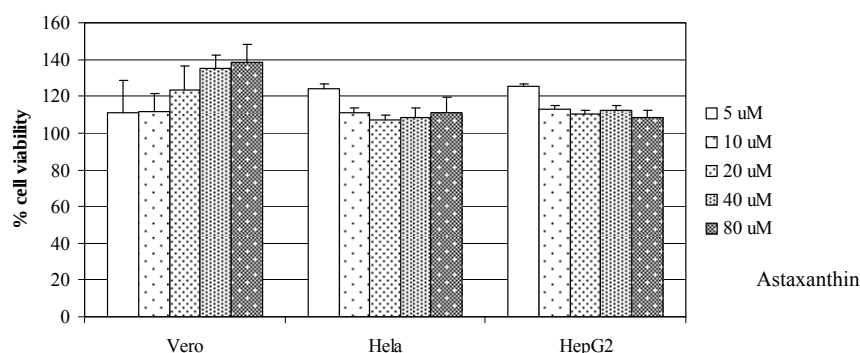
รูปที่ 19 เปอร์เซนต์ความมีชีวิตของเซลล์ที่ความเข้มข้นระดับต่างๆของตัวกระตุ้น t-BHP ในเซลล์ไลน์ vero ($\square$), HeLa ($\boxplus$) และ HepG2 ($\boxtimes$)

2.3 การทดสอบความเป็นพิษของแอสตาแซนทินที่สกัดจากยีสต์ และผลการยับยั้งเซลล์มะเร็ง

2.3.1 การศึกษาผลของแอสตาแซนทินต่อความมีชีวิตของเซลล์

การทดสอบความเป็นพิษของแอสตาแซนทินที่สกัดได้จากยีสต์ โดยการใส่แอสตาแซนทินที่สกัดได้จากยีสต์ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 5, 10, 20, 40 และ 80 μM พบว่าแอสตาแซนทินไม่เป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ทั้ง 3 ชนิดที่ทุกความเข้มข้นของแอสตาแซนทินที่ใช้ในการทดสอบดังแสดงในรูปที่ 20 ในขณะที่มีผลให้อัตราการเจริญของเซลล์เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับตัวควบคุมที่ไม่มีสาร และให้ผลเพิ่มการเจริญของเซลล์ได้ดีที่สุดในเซลล์ชนิด Vero ซึ่งเป็นเซลล์ปกติ รองลงมาคือ HepG2 และ HeLa ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแอสตาแซนทินที่สกัดได้จากยีสต์ ไม่มีฤทธิ์ในการทำลายเซลล์มะเร็งทั้งสองชนิดที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ และแอสตาแซนทินมีความปลอดภัยสามารถกระตุ้นการเจริญของเซลล์ได้ อย่างไรก็ตามลักษณะความมีชีวิตของเซลล์ HeLa และ HepG2 ที่ไม่แปรตามความเข้มข้นของแอสตาแซนทินดังเช่นพบในเซลล์ Vero และที่มีรายงานการศึกษาใน neuronal stem cell (Kim, et al. 2010) ทำให้ต้องทำการ

ตรวจสอบเพื่อยืนยันผลของแอสตาแซนทินกับเซลล์มะเร็ง โดยใช้วิธีการทดสอบด้วย clonogenic assay ซึ่งจะมีความไวมากกว่า



รูปที่ 20 ผลของแอสตาแซนทินที่สกัดได้จากยีสต์ต่อความมีชีวิตของเซลล์ Vero, HeLa และ HepG2

2.3.2 การศึกษาความสามารถยับยั้งการเจริญเป็นโคโลนีของเซลล์

การศึกษาความสามารถยับยั้งการเจริญเป็นโคโลนีของเซลล์ (clonogenic assay) โดยการเติมแคโรทีนอยด์แต่ละชนิดให้กับเซลล์เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำเซลล์มาเจือจางให้ได้ 200 เซลล์ต่อหลุมแล้วนำไปเพาะเลี้ยงใน 6 well plate หลังจาก 7 – 9 วัน จึงนำมาย้อมด้วย crystal violet เพื่อนับจำนวนโคโลนีของเซลล์เปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้เติมสารทดสอบ พบว่าจำนวนโคโลนีของเซลล์ Vero เมื่อบ่มกับสารทดสอบมีจำนวนมากกว่าชุดควบคุมเล็กน้อย (ตารางที่ 1) ในขณะที่จำนวนโคโลนีของเซลล์มะเร็งทั้งสองชนิดมีค่าน้อยกว่าชุดควบคุมเล็กน้อย แสดงถึงแนวโน้มความเป็นไปได้ที่สารในกลุ่มแคโรทีนอยด์อาจมีผลต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็ง ที่อาจจะสามารถแสดงผลได้ชัดเจนมากขึ้นเมื่อให้สารในระยะยาว

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนโคโลนีของเซลล์ที่บ่มร่วมกับแคโรทีนอยด์เปรียบเทียบกับเซลล์ควบคุม

Cell type	β -carotene	Yeast extracts	Synthetic astaxanthin
Vero	102.26* (3.51)	105.27 (5.51)	100.76 (4.73)
HeLa	96.79 (2.52)	95.59 (3.51)	92.59 (3.00)
HepG2	95.89 (4.36)	94.98 (3.00)	93.86 (3.21)

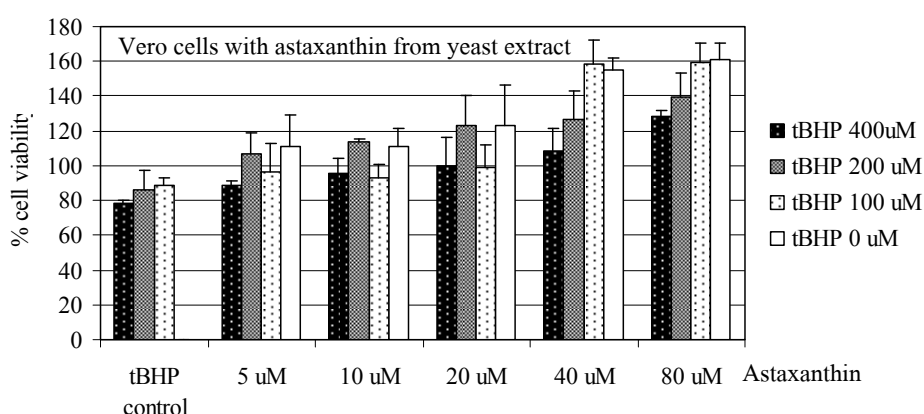
*จำนวนโคโลนี เปอร์เซ็นต์ (SD)

2.4 ความสามารถต้านออกซิเดชันที่เกิดจาก *tert*-butyl hydroperoxide ของแอสตาแซนทินที่สกัดได้จากยีสต์

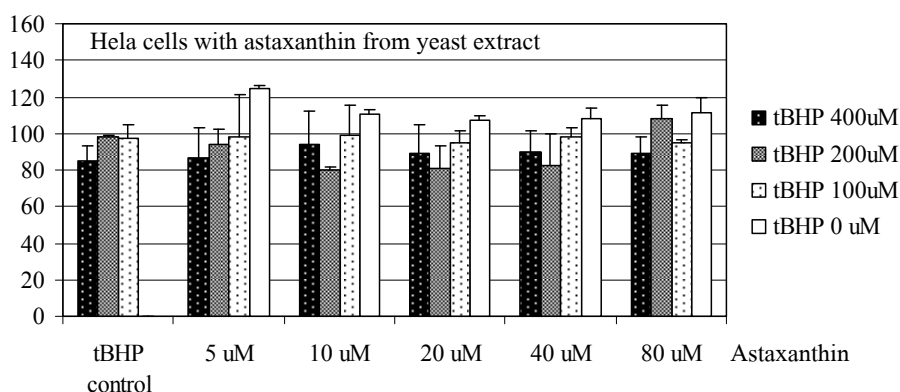
2.4.1 ตรวจสอบโดยการวัดความมีชีวิตของเซลล์ (cell viability assay)

เมื่อทดสอบผลของ t-BHP ที่ความเข้มข้น 100, 200 และ 400 μM ในสภาวะที่มีแอสตาแซนทินที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 5, 10, 20, 40 และ 80 μM และมีตัวควบคุมคือ 1% DMSO ซึ่งใช้เป็นตัวแทนละลายของแอสตาแซนทิน โดยการบ่มเซลล์กับสารทดสอบเป็นเวลา 3 ชั่วโมงที่ 37 $^{\circ}\text{C}$ แล้วนำมาตรวจสอบความมีชีวิตของเซลล์โดยวิธี MTT assay

ผลการด้านภาวะเครียดออกซิเดชันของแอสตาแซนทินที่สกัดได้จากยีสต์ต่อ t-BHP ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 21 และ 22 พบว่า t-BHP ที่ความเข้มข้น 100, 200, 400 μM ทำให้ความมีชีวิตของเซลล์ลดลงเมื่อเทียบกับเปอร์เซ็นต์กับเซลล์ control ตามระดับความเข้มข้นของ t-BHP ที่มากขึ้น ในขณะที่เมื่อบ่มกับ t-BHP ในสภาวะที่มีแอสตาแซนทินที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าแอสตาแซนทินจะสามารถช่วยให้ความมีชีวิตของเซลล์เพิ่มขึ้นในระดับต่างๆ โดยแอสตาแซนทินที่ความเข้มข้น 5 μM สามารถต้านภาวะออกซิเดชันที่เกิดจาก t-BHP ที่ระดับ 100 หรือ 200 μM ได้แล้วและทำให้ความมีชีวิตของเซลล์เพิ่มขึ้นเท่ากับเมื่อไม่มีสาร t-BHP ขณะที่แอสตาแซนทินที่ความเข้มข้นสูงขึ้นมากกว่า 40 μM สามารถต้านภาวะเครียดออกซิเดชันที่เกิดจาก t-BHP ในทุกระดับความเข้มข้นที่ทดสอบได้ แล้วทำให้เซลล์มีชีวิตเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามแอสตาแซนทินมีแนวโน้มป้องกันภาวะเครียดจาก t-BHP ในเซลล์ Vero ได้ดีกว่าเซลล์ Hela ที่ระดับความเข้มข้นของตัวกระตุ้นของ t-BHP ที่เท่ากัน

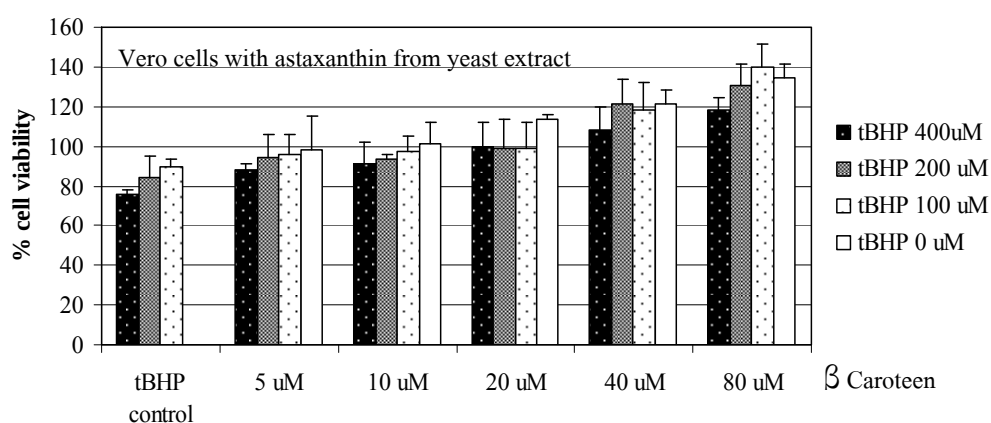


รูปที่ 21 ความสามารถต้านออกซิเดชันที่เกิดจาก *tert*-butyl hydroperoxide ของแอสตาแซนทินที่สกัดได้จากยีสต์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในเซลล์ไลน์ Vero โดยการวัดความมีชีวิตของเซลล์

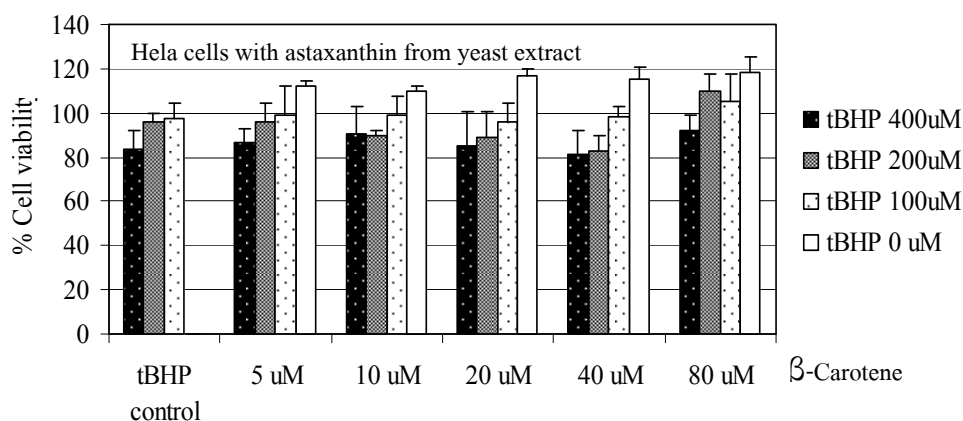


รูปที่ 22 ความสามารถต้านออกซิเดชัน ที่เกิดจาก *tert*-butyl hydroperoxide ของแอสตาแซนทินที่สกัดได้จากยีสต์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในเซลล์ไลน์ HeLa โดยการวัดความมีชีวิตของเซลล์

การศึกษาทำนองเดียวกันกับการต้านภาวะเครียดออกซิเดชันของ β -carotene ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 23 และ 24 พบว่า β -carotene สามารถช่วยให้ความมีชีวิตของเซลล์เพิ่มขึ้น เมื่อความเข้มข้นของ β -carotene เพิ่มขึ้น และสามารถลดการตายที่เกิดจาก t-BHP ได้ โดยความมีชีวิตของเซลล์ที่เพิ่มขึ้นในเซลล์ Vero ต่ำกว่าผลจากแอสตาแซนทินที่สกัดจากยีสต์ และในการทำนองเดียวกันกับเซลล์ HeLa ที่ให้ผลการป้องกันเซลล์ไม่ดีเท่ากับเซลล์ Vero



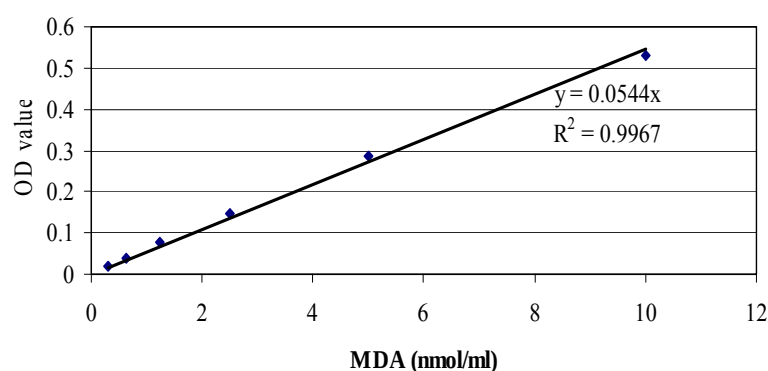
รูปที่ 23 ความสามารถต้านออกซิเดชัน ที่เกิดจาก *tert*-butyl hydroperoxide ของ β -carotene ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในเซลล์ไลน์ Vero โดยการวัดความมีชีวิตของเซลล์



รูปที่ 24 ความสามารถต้านออกซิเดชัน ที่เกิดจาก *tert*-butyl hydroperoxide ของ β -carotene ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในเซลล์ไลน์ Hela โดยการวัดความมีชีวิตของเซลล์

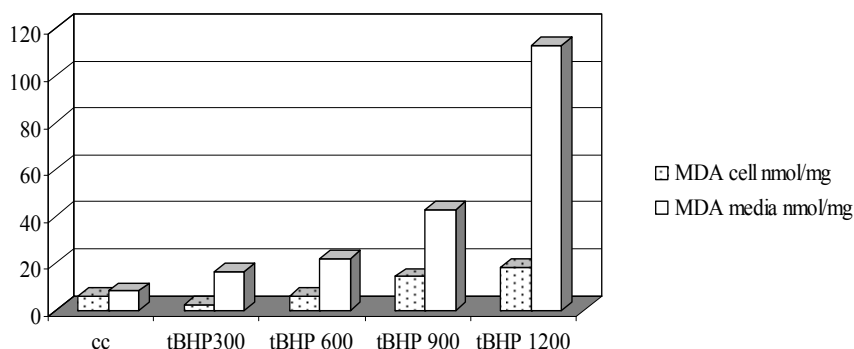
2.4.2 ความสามารถต้าน lipid peroxidation ของสารแอสตาแซนทินที่สกัดได้จากยีสต์โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี Thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) assay

การตรวจวัดภาวะเครียดออกซิเดชันโดยวัดระดับการสลายตัวของไขมัน (lipid peroxidation) ซึ่งเป็นผลมาจากตัวกระตุ้นที่ทำให้เกิดสารอนุมูลอิสระที่มีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งมีส่วนประกอบของไขมันสายยาวชนิดไม่อิ่มตัว (polyunsaturated fatty acid) เกิดเป็นสารประกอบ lipid hydroperoxide ซึ่งจะสลายตัวให้สารประกอบในกลุ่มของ alkane และ aldehyde หลายชนิด แต่ชนิดที่เกิดมากที่สุดคือ Malondialdehyde (MDA) ซึ่งเป็นสารประกอบคาร์บอน 3 อะตอม สามารถตรวจวัดได้ด้วยวิธี TBARS assay (Dubuisson *et al.*, 2000) โดยการนำสารละลายที่ต้องการตรวจวัดปริมาณ MDA ไปทำปฏิกิริยากับ thiobarbituric acid (TBA) ในสภาวะที่เป็นกรดของ trichloroacetic acid ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 30 นาทีแล้วจึงสกัดสาร malondialdehyde (MDA) จากการทำปฏิกิริยาที่ได้ด้วย n-butanol แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 nm เทียบกับกราฟมาตรฐานของ MDA ดังแสดงในรูปที่ 25



รูปที่ 25 กราฟมาตรฐานของสารละลาย MDA (nmol/ml) กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 nm

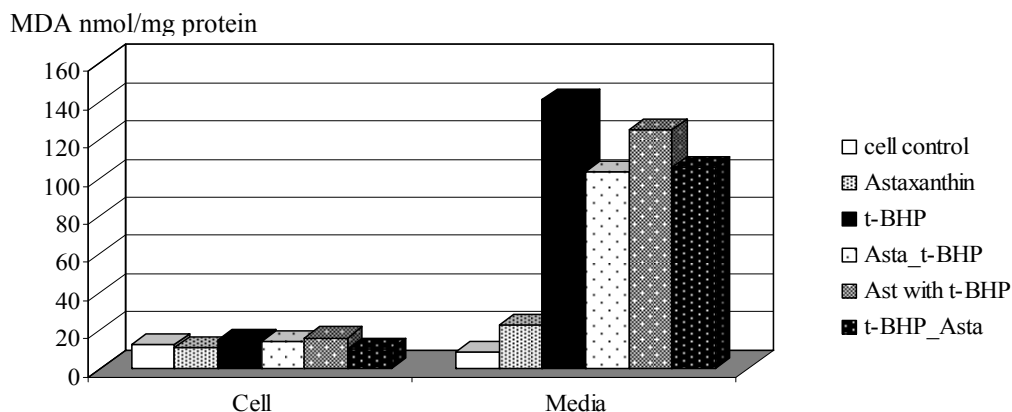
การศึกษาระดับของ MDA จากการตอบสนองของเซลล์ Vero ต่อภาวะเครียดออกซิเดชันที่เป็นผลจากตัวกระตุ้น t-BHP ในสถานะที่ศึกษาที่ 300, 600, 900 และ 1200 μM จะเห็นได้ว่าสามารถตรวจวัดระดับของ MDA ได้ทั้งในเซลล์และในสารอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยค่าของ MDA จากเซลล์และในสารอาหารจะมีค่าผันแปรโดยตรงกับความเข้มข้นของตัวกระตุ้น t-BHP ที่เพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 26



รูปที่ 26 ระดับของ MDA (nmol/mg cell protein) จากเซลล์ Vero ต่อภาวะเครียดออกซิเดชันที่เป็นผลจากตัวกระตุ้น t-BHP ที่ 300, 600, 900 และ 1200 μM

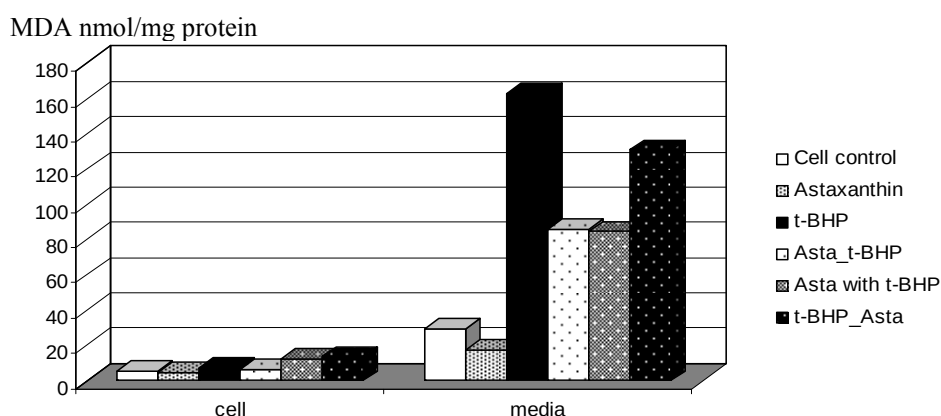
การศึกษาศามารถด้าน lipid peroxidation ทำโดยการบ่มเซลล์กับตัวกระตุ้น t-BHP ในสถานะต่างๆ 3 แบบ คือ 1) ใส่สารละลายแอสตาแซนทินก่อนใส่สารกระตุ้น t-BHP 2) ใส่สารละลายแอสตาแซนทินพร้อมกับสารกระตุ้น และ 3) ใส่สารละลายแอสตาแซนทินหลังจากการบ่มกับสารกระตุ้น โดยมีสถานะที่มี t-BHP หรือแอสตาแซนทินอย่างเดียวเป็นตัวควบคุม จากนั้นทำการวิเคราะห์ค่า lipid peroxidation จากเซลล์และสารละลายอาหารโดยวิธี TBARS assay

ผลของแอสตาแซนทินในการต้านภาวะเครียดออกซิเดชันจาก t-BHP ในเซลล์ไลน์ Vero หลังจากการกระตุ้นด้วย t-BHP เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทั้งในสถานะการเติมแอสตาแซนทินก่อนหรือหลังการกระตุ้น หรือใส่แอสตาแซนทินพร้อมกันกับตัวกระตุ้น ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 27 จะเห็นได้ว่าแอสตาแซนทินสามารถบรรเทาภาวะเครียดออกซิเดชันที่เกิดขึ้นได้ และทำให้ได้ค่าของ MDA ที่เกิดขึ้นต่ำกว่าเมื่อมีตัวกระตุ้น t-BHP อย่างเดียว โดยผลการใส่แอสตาแซนทินทั้งก่อนและหลังการกระตุ้นให้ผลบรรเทาภาวะเครียดออกซิเดชันในระดับใกล้เคียงกัน แต่การใส่แอสตาแซนทินพร้อมกันกับตัวกระตุ้นกลับให้ผลบรรเทาภาวะเครียดได้น้อยกว่า อาจเนื่องจากแอสตาแซนทินถูกยับยั้งด้วยตัวกระตุ้นที่อยู่ในสารละลายขณะนั้น นอกจากนี้ผลการใส่แอสตาแซนทินในเซลล์หลังการกระตุ้นแสดงถึงแนวโน้มการฟื้นตัวของเซลล์โดยระดับของ MDA ที่อยู่ในเซลล์จะมีค่าใกล้เคียงกับสถานะที่ใส่แอสตาแซนทินเพียงอย่างเดียว



รูปที่ 27 ความสามารถต้านภาวะเครียดออกซิเดชันจาก t-BHP ของแอสตาแซนทินในเซลล์ไลน์ Vero ในระยะเวลา 2 ชั่วโมง

นอกจากนี้ ได้ตรวจสอบผลของแอสตาแซนทินในการต้านภาวะเครียดออกซิเดชันจาก t-BHP หลังการกระตุ้นกับ t-BHP นาน 2 ชั่วโมง ตามสภาวะการทดลองข้างต้น ต่อมเซลล์ต่อเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมงก่อนวิเคราะห์ผล พบว่าผลกระทบจากตัวกระตุ้นเมื่อเติมแอสตาแซนทินก่อนและเติมพร้อมกัน ยังคงมีผลต่อระดับของ MDA ดังแสดงในรูปที่ 28 ขณะที่การใส่แอสตาแซนทินหลังการกระตุ้นไม่สามารถช่วยบรรเทาภาวะเครียดได้ดั่งนึก แต่ก็ดีกว่าสภาวะที่มีตัวกระตุ้นอย่างเดียว แสดงว่าแอสตาแซนทินช่วยบรรเทาภาวะเครียดออกซิเดชันได้ในระยะแรก แต่ไม่สามารถช่วยฟื้นฟูคุณภาพของเซลล์ได้เท่ากับเมื่อเติมแอสตาแซนทินก่อนการกระตุ้น หรือกระตุ้นพร้อมกันกับเติมแอสตาแซนทิน



รูปที่ 28 ความสามารถต้านภาวะเครียดออกซิเดชันจาก t-BHP ของแอสตาแซนทินในเซลล์ไลน์ Vero หลังจาก 24 ชั่วโมง

2.5 การทดสอบคุณสมบัติ antioxidant activity โดย DPPH assay (cell free system)

2.5.1 การศึกษาเพื่อหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการวิเคราะห์

ทดสอบตัวทำละลายของสารละลายตัวอย่างที่ละลายได้ดีในไขมันในการวัด Antioxidant activity ด้วย DPPH assay โดยใช้ตัวทำละลาย 7 ชนิด คือ Methanol , Dichloromethane , DMSO , Petroleum ether , THF , Hexane , และ Ethyl acetate ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มีรายงานว่าสามารถละลายแอสตาแซนทินได้ดี และวัดการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH ที่เกิดจากสารละลาย โดยใช้เครื่องมือ 2 ประเภท คือ Microplate reader และ Spectrophotometer ซึ่งอัตราส่วน DPPH : solvent ที่อ่านด้วย Microplate reader เป็น 180 μ l : 20 μ l และใช้อัตราส่วน DPPH : solvent = 2.7 ml : 0.3 ml ในการอ่านค่าด้วย Spectrophotometer พบว่า Hexane และ Petroleum ether ไม่สามารถละลายเป็นเนื้อเดียวกับสารละลาย DPPH ซึ่งแสดงถึงการเป็นสารละลายที่ไม่เหมาะสมในการละลายแอสตาแซนทินสำหรับการทำ DPPH assay

การศึกษหาตัวทำละลายแอสตาแซนทินที่เหมาะสมสำหรับทำ DPPH assay สารละลายนั้นจะต้องไม่ทำปฏิกิริยากับ DPPH ให้เปลี่ยนไป และจากผลของ kinetic reaction ของตัวทำละลายที่ทดสอบพบว่า THF มีผลต่อความเสถียรของ DPPH ทำให้อนุผลของ DPPH ลดลงอย่างรวดเร็วกว่า dichloromethane, petroleum ether, methanol, hexane, ethyl acetate and DMSO ภายใน 1 ชั่วโมงตามลำดับ ขณะที่ตัวทำละลายที่มีค่า R^2 เข้าใกล้ 1 แสดงถึงการเป็น reducing agent มากกว่าตัวทำละลายที่มีค่า R^2 เข้าใกล้ 0 ดังนั้น DMSO และ ethyl acetate จึงเป็นตัวทำละลายที่เหมาะสม อย่างไรก็ตาม ethyl acetate ละลายพลาสติกจึงไม่เหมาะกับการนำมาใช้กับ microplate จึงมีเพียง DMSO ที่เป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุด

2.5.2 ความสามารถด้านอนุมูลอิสระของ Astaxanthin และ β -carotene เทียบกับ α -tocopherol ด้วยวิธี DPPH assay

พบว่าสารแอสตาแซนทินของตัวอย่างมีสีแดง หรือส้ม ซึ่งรบกวนระบบการอ่านทำให้ค่าดูดกลืนแสงสูงสุด (λ max) ของ Astaxanthin เปลี่ยนไปเป็น 500 nm และของ β -carotene เปลี่ยนไปเป็น 512 nm แก้ไขด้วยการอ่านค่าที่ λ max ร่วมกับการหักลบค่าอ้างอิงในสถานะที่ไม่มีสารละลายอนุมูล DPPH ทำให้ทราบค่า EC50 (Effective dose concentration 50) เป็น 41.99, 119.86, 186.01 และ 248.57 μ M ตามลำดับ ซึ่งแสดงถึงความสามารถด้านอนุมูลอิสระของ Astaxanthin > β -carotene > α -tocopherol > carotenoid extract ตามลำดับ โดยแอสตาแซนทินมีฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระมากกว่า β -carotene และ α -tocopherol เป็น 2.85 และ 4.43 เท่าตามลำดับ แต่ carotenoid extract จากยีสต์มีฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระค่อนข้างต่ำ เนื่องจากการปนเปื้อนของตัวทำละลายในการสกัดที่มีผลต่อความเข้มข้นของ astaxanthin

นอกจากนี้สารสกัดที่ได้จะมีส่วนของ astaxanthin อยู่ 74% จึงมีผลให้ความสามารถด้านอนุมูลอิสระต่ำกว่าเมื่อเทียบกับแอสตาแซนทินบริสุทธิ์

ส่วนที่ 3 การปรับปรุงการนำส่งแอสตาแซนทินสู่เซลล์และประเมินประสิทธิภาพการนำส่ง

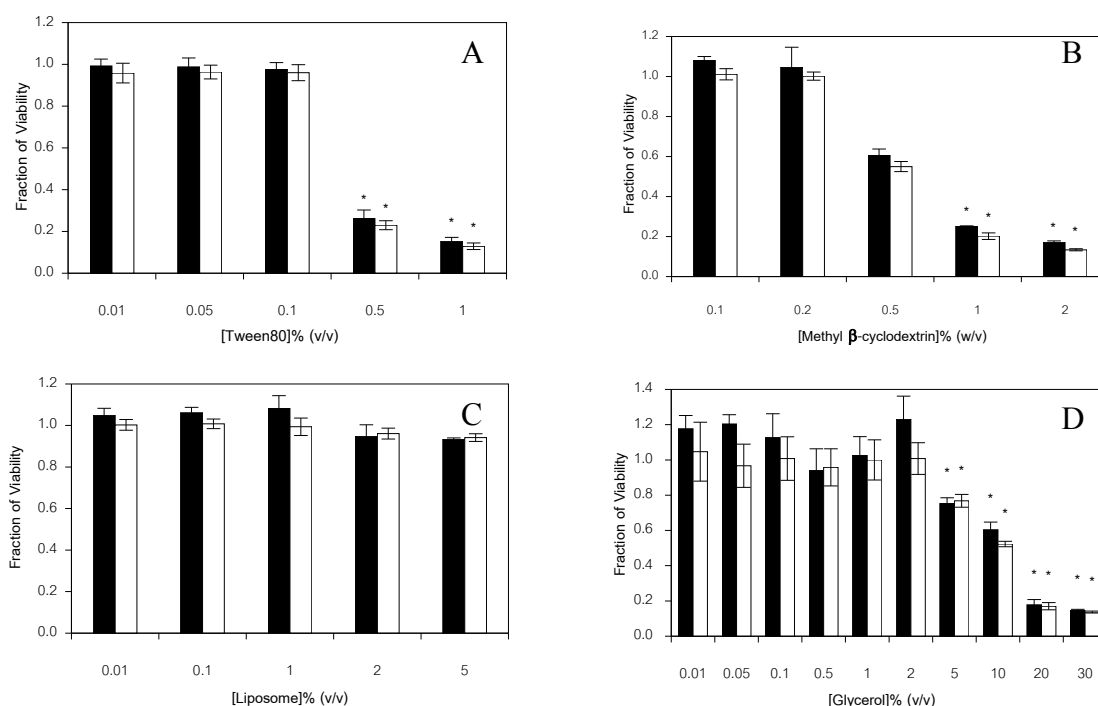
การปรับปรุงการนำส่งแอสตาแซนทินเข้าสู่เซลล์ ต้องพิจารณาถึงคุณสมบัติที่สำคัญของแอสตาแซนทิน คือ ความชอบไขมัน ที่ทำให้สามารถละลายในน้ำได้น้อย (รวมทั้งในอาหารเลี้ยงเซลล์) ซึ่งเป็นข้อจำกัดในการศึกษาวิจัยการนำแอสตาแซนทินไปใช้ประโยชน์ในระบบเซลล์เพาะเลี้ยงของสัตว์ ดังนั้นทีมผู้วิจัยจึงได้ทำการคัดเลือกสารที่เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ในกลุ่มของพอลิเมอร์ชนิด Lipid-based ได้แก่ methyl β -cyclodextrin (M β -CD) และ liposome ที่มีโครงสร้างทางเคมีในลักษณะเป็นถุงหุ้มที่สามารถบรรจุสารได้ดี รวมทั้งการใช้สารลดแรงตึงผิว (surfactant) ได้แก่ tween 80 และ glycerol ที่มีคุณสมบัติช่วยในการแพร่และแทรกซึมของสารเข้าสู่เซลล์ ซึ่งมีรายงานการนำไปใช้กันอย่างแพร่หลายทางด้านชีวโมเลกุลและในอุตสาหกรรมอาหาร หรือเครื่องสำอาง ในที่นี้เป็นการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของพาหะนำส่งที่ไม่ก่อความเป็นพิษต่อเซลล์ แล้วจึงเลือกใช้พาหะที่ให้ประสิทธิภาพการนำส่งแอสตาแซนทินได้ดีต่อไป

3.1 ความเป็นพิษของพาหะนำส่ง

การทดสอบความเป็นพิษของพาหะนำส่งทำโดยใช้เซลล์ human hepatocellular carcinoma (HepG2) ที่ระยะการบ่มเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง มาบ่มกับสารทดสอบที่กล่าวข้างต้น (tween 80, M β -CD, liposome และ glycerol) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบความมีชีวิตของเซลล์ด้วย MTT reduction assay เปรียบเทียบกับสถานะที่ไม่สารทดสอบ

ในรูปที่ 29 แสดงสัดส่วนของความมีชีวิตของเซลล์ในสถานะที่มีพาหะนำส่งเทียบกับสถานะที่ปราศจากพาหะนำส่ง พบว่าการบ่มเซลล์ร่วมกับ tween 80 (รูป 29 A) ในช่วงความเข้มข้น 0.01-1% (v/v), M β -CD (รูป 29 B) ที่ความเข้มข้น 0.1-2% (w/v) และ glycerol (รูป 29 D) ที่ความเข้มข้น 0.01-30% (v/v) ในระยะเวลาการบ่มนาน 24 และ 48 ชั่วโมง จะมีผลให้ค่าสัดส่วนของความมีชีวิตของเซลล์ลดลงเมื่อความเข้มข้นของพาหะมากขึ้น โดยพบว่าความเข้มข้นของ tween 80, M β -CD และ glycerol ที่มากกว่า 0.1% (v/v), 0.2% (w/v) และ 2% (v/v) ตามลำดับจะเป็นระดับความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์ โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับเซลล์ในสถานะที่ปราศจากพาหะนำส่ง แต่ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างเวลาทดสอบ 24 และ 48 ชั่วโมง ส่วน liposome พบว่าค่าสัดส่วนความมีชีวิตของเซลล์ของทุกความเข้มข้นที่ใช้ (0.01-5% (v/v)) ไม่มีความเป็นพิษ (รูป 29 C) ดังนั้นความเข้มข้นของพาหะนำส่งในระดับที่ไม่เป็นพิษ จึงเป็นระดับความเข้มข้นที่นำมาใช้ส่งถ่ายแอสตาแซนทินสู่เซลล์ได้

ซึ่งในที่นี้จะเป็นการศึกษา tween 80, M β -CD และ liposome ที่มีความนิยมในการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร หรือเครื่องสำอางกันมาก



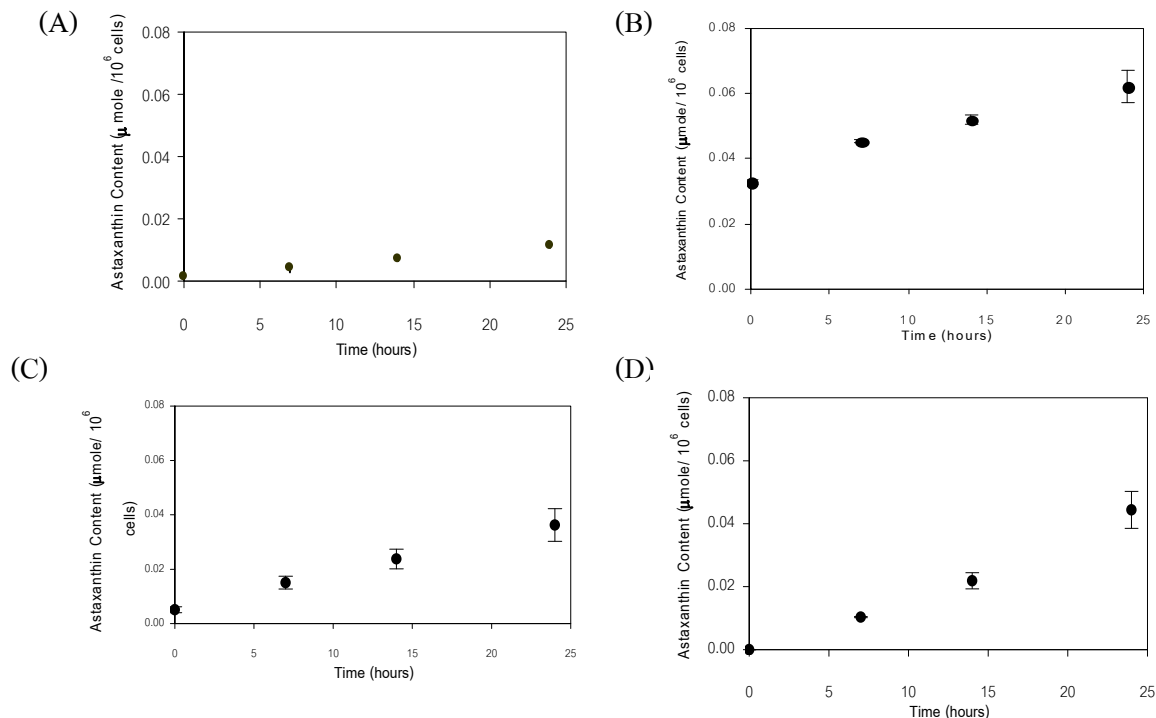
รูปที่ 29 สัดส่วนของควมมีชีวิตของเซลล์หลังบ่มกับพาหะนำส่ง (A) Tween 80 (B) M β -CD (C) Liposome และ (D) Glycerol ที่เวลา 24 ชั่วโมง (solid bars) และ 48 ชั่วโมง (open bars) แสดงผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

* แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับสภาวะที่ปราศจากพาหะนำส่ง

3.2 ประสิทธิภาพการนำส่งของพาหะนำส่งในเซลล์ไลน์

เตรียมสารประกอบของพาหะนำส่ง (tween 80, 0.1% v/v; M β -CD, 0.2% w/v และ liposome, 5% v/v) กับแอสตาแซนทินที่ความเข้มข้น 10 μ M เพื่อทดสอบความสามารถของพาหะนำส่งในการนำส่งแอสตาแซนทินเข้าสู่เซลล์ โดยการบ่มเซลล์กับสารทดสอบที่เตรียมไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงสกัดแอสตาแซนทินจากเซลล์มาวิเคราะห์ปริมาณด้วยวิธี HPLC แล้วรายงานผลเป็นปริมาณของแอสตาแซนทินต่อปริมาณเซลล์ที่ใช้ทดสอบ 10^6 เซลล์ที่ระยะเวลาการบ่ม 24 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 30 และประเมินประสิทธิภาพการนำส่งแอสตาแซนทินโดยการคำนวณหาค่าคงที่ซึ่งบ่งบอกถึงอัตราของการนำส่งจากความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแอสตาแซนทินภายในเซลล์กับเวลาดังแสดงในตารางที่ 2 นอกจากนี้ ได้ประเมินเปรียบเทียบปริมาณแอสตาแซนทินในอาหารในสภาวะที่ไม่มีเซลล์ร่วมด้วย เพื่อศึกษาถึงโอกาสการเสียดาของแอสตาแซนทินในสภาวะทดสอบ

จากรูปที่ 30 เมื่อเปรียบเทียบปริมาณแอสตาแซนทินภายในเซลล์ พบว่าพาหะนำส่งสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการนำส่งแอสตาแซนทินเมื่อเปรียบเทียบกับสถานะที่ปราศจากพาหะนำส่งได้ (รูปที่ 30 A) โดย tween 80 สามารถนำส่งแอสตาแซนทินให้ได้ปริมาณแอสตาแซนทินสูงตั้งแต่เริ่มต้นดีกว่าสถานะทดสอบอื่นๆ และให้ได้ปริมาณแอสตาแซนทินในเซลล์สูงที่สุดในระยะการบ่มภายในเวลา 24 ชั่วโมง (รูปที่ 30 B) ขณะที่ liposome (รูปที่ 30 D) และ M β -CD (รูปที่ 30 C) มีการนำส่งให้ปริมาณแอสตาแซนทินในเซลล์ได้ใกล้เคียงกัน โดยปริมาณแอสตาแซนทินสูงสุดที่นำส่งเข้าสู่เซลล์ในสถานะที่มี liposome, M β -CD, tween 80 และปราศจากพาหะนำส่งที่เวลา 24 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 0.044, 0.036, 0.062 และ 0.015 $\mu\text{M}/10^6$ cells ตามลำดับ การที่ tween 80 สามารถนำส่งแอสตาแซนทินสู่เซลล์ได้ในปริมาณมากที่สุด อาจเนื่องมาจากความสามารถกักเก็บแอสตาแซนทินมีค่ามากกว่าตัวนำส่งอื่นๆ หรือ tween 80 สามารถสัมผัสและนำแอสตาแซนทินเข้าสู่เซลล์ได้ดีที่สุด อย่างไรก็ตาม การตรวจสอบการคงเหลือของแอสตาแซนทินในสถานะที่ไม่มีเซลล์หลังการบ่มนาน 24 ชั่วโมง พบว่าแอสตาแซนทินใน tween 80 มีการลดลงมาก ขณะที่ในสถานะการทดสอบอื่นๆ มีการลดลงน้อยกว่าดังค่าคงที่ของการลดลงของปริมาณแอสตาแซนทินที่แสดงในตารางที่ 2 ดังนั้น แม้ tween 80 จะเป็นพาหะนำส่งแอสตาแซนทินได้ดีที่สุด แต่ความไม่เสถียรของแอสตาแซนทินใน tween 80 ทำให้ต้องเลือกใช้พาหะอื่นในการนำส่งแอสตาแซนทินแทนซึ่งพบว่า liposome และ M β -CD สามารถรักษาความเสถียรของแอสตาแซนทินได้ดีกว่า tween 80



รูปที่ 30 ปริมาณแอสตาแซนทินในเซลล์ในสถานะที่มีและที่ปราศจากพาหะนำส่ง (A) No vehicle (B) tween 80 (C) M β -CD และ (D) Liposome ในระยะเวลา 24 ชั่วโมง รายงานผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางที่ 2 ค่าคงที่ของการลดลงของปริมาณแอสตาแซนทินในอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่อุณหภูมิ 37 °C

Treatment	k [hour ⁻¹]
No vehicle	0.019 ± 0.005
Tween 80	0.011 ± 0.005
Mβ-CD	0.006 ± 0.006
Liposome	0.006 ± 0.004

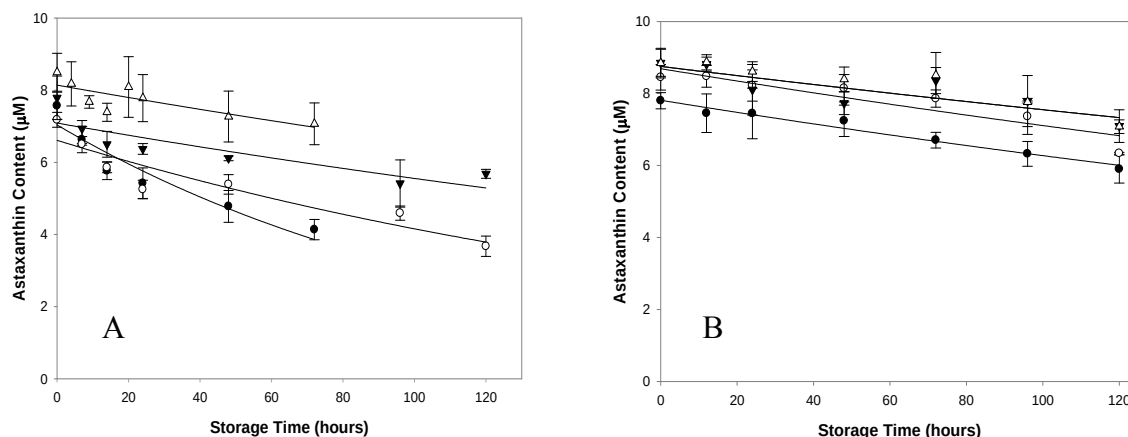
ตารางที่ 3 ค่าคงที่ของการนำส่งแอสตาแซนทินเข้าสู่เซลล์ HepG2 ในสถานะที่มีและไม่มีพาหะนำส่ง

Treatment	k [hour ⁻¹]
No vehicle	0.078 ± 0.011
Tween 80	0.025 ± 0.005
Mβ-CD	0.079 ± 0.019
Liposome	0.110 ± 0.017

เมื่อพิจารณาการนำส่งแอสตาแซนทินสู่เซลล์ในรูปแบบที่ 2 พบว่าเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นปริมาณแอสตาแซนทินก็เพิ่มขึ้น โดยมีความสัมพันธ์เป็นแบบเชิงเส้นกับเวลา ความสัมพันธ์ดังกล่าวเป็นไปตามหลักจลนพลศาสตร์ของอัตราการเกิดปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง โดยประสิทธิภาพการนำส่งแอสตาแซนทินสามารถประเมินได้จากค่าคงที่ของปฏิกิริยาแสดงในตารางที่ 2 ซึ่งพบว่า liposome มีค่าการนำส่งสูงที่สุด (ค่าคงที่เท่ากับ 0.110 hr⁻¹) เมื่อเปรียบเทียบกับพาหะนำส่งชนิดอื่นและที่ปราศจากพาหะนำส่ง ในขณะที่ Mβ-CD มีประสิทธิภาพสูงกว่าเมื่อเทียบกับ tween 80 โดยค่าคงที่ของการนำส่งมีค่าเท่ากับ 0.079 และ 0.025 hr⁻¹ ตามลำดับ ดังนั้น liposome จึงเป็นพาหะนำส่งที่น่าสนใจและได้นำมาใช้ในการทดสอบต่อไป

3.3 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของแอสตาแซนทินที่มีพาหะนำส่ง

แอสตาแซนทินเป็นสารที่สลายตัวได้ง่ายโดยอุณหภูมิ และแสง ซึ่งทำให้สูญเสียคุณสมบัติ/ฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระ งานวิจัยนี้จึงทดสอบความเสถียรของแอสตาแซนทินในสถานะที่มีและที่ปราศจากพาหะนำส่ง โดยบ่มที่อุณหภูมิห้อง (วัดได้ 25-28 °C) และที่ 4 °C ในที่มีมืด เป็นเวลา 120 ชั่วโมง จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณแอสตาแซนทินโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร รายงานผลความเสถียรของแอสตาแซนทินเป็นค่าความเข้มข้นของแอสตาแซนทินในหน่วย μM ที่คำนวณได้จากกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของแอสตาแซนทินกับแอสตาแซนทินที่แปรผันความเข้มข้นในช่วง 5-40 μM แล้วประเมินค่าทางสถิติที่นัยสำคัญเท่ากับ 0.001



รูปที่ 31. ความเสถียรของแอสตาแซนทินความเข้มข้น 10 μM ในสถานะที่มีและไม่มีพาหะนำส่ง ในช่วงเวลา 0–120 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (25–28 $^{\circ}\text{C}$), รูป A และที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}\text{C}$, รูป B
(●) No vehicle (○) Tween 80 (▼) $\text{M}\beta\text{-CD}$ และ (△) Liposome

ตารางที่ 4 ค่าคงที่ของการลดลงของปริมาณแอสตาแซนทินที่อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}\text{C}$

Treatment	Room temperature	4 $^{\circ}\text{C}$
	k [hour^{-1}]	k [hour^{-1}]
No vehicle	0.009	0.002
Tween 80	0.005	0.002
$\text{M}\beta\text{-CD}$	0.002	0.001
Liposome	0.003	0.002

จากรูป 3 A ที่ศึกษาเปรียบเทียบปริมาณแอสตาแซนทินที่บ่มที่อุณหภูมิห้อง พบว่าการมีพาหะนำส่งจะสามารถช่วยส่งเสริมความเสถียรของแอสตาแซนทินได้ดีกว่าสถานะที่ปราศจากพาหะนำส่ง โดย $\text{M}\beta\text{-CD}$ และ liposome สามารถรักษาความเสถียรของแอสตาแซนทินได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ tween 80 ภายในเวลาของการทดสอบ 75–120 ชั่วโมง และเมื่อพิจารณาค่าคงที่ของการลดลงของปริมาณแอสตาแซนทิน (k) (ตารางที่ 4) พบว่าในสถานะที่มีพาหะนำส่ง $\text{M}\beta\text{-CD}$ แอสตาแซนทินมีอัตราการสลายตัวต่ำที่สุด (เท่ากับ 0.002 hr^{-1}) และ liposome มีอัตราการสลายตัวของแอสตาแซนทินเท่ากับ 0.003 hr^{-1} ต่ำกว่าของพาหะนำส่ง tween 80 ที่มีค่าเท่ากับ 0.005 hr^{-1} ส่วนความเสถียรของแอสตาแซนทินที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}\text{C}$ พบว่าพาหะนำส่งที่ใช้ไม่ได้มีผลไปส่งเสริมความเสถียรของแอสตาแซนทินเมื่อเทียบกับสถานะที่ปราศจากพาหะนำส่ง และการเก็บที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}\text{C}$ จะสามารถรักษาความเสถียรได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับสถานะปราศจากพาหะนำส่งที่อุณหภูมิห้อง

3.4 แบบจำลองของระบบนำส่งแอสตาแซนทิน

การออกแบบแบบจำลองโดยใช้ระบบทางคณิตศาสตร์ในการอธิบายกลไกของระบบนำส่งแอสตาแซนทินด้วยพาหะนำส่งทำได้ดังนี้



โดยที่ s หมายถึง ผิวเซลล์ i หมายถึง ภายในเซลล์ และ deg หมายถึง การย่อยสลาย

L หมายถึง ความเข้มข้นของ liposome (มีหน่วยเป็น M)

As หมายถึง ความเข้มข้นของแอสตาแซนทิน (มีหน่วยเป็น M)

$L-As$ หมายถึง ความเข้มข้นของ complex ของ liposome กับแอสตาแซนทิน (มีหน่วยเป็น M)

x หมายถึง จำนวนของแอสตาแซนทินต่อ liposome

K หมายถึง ค่าคงที่สมดุลของการบรรจุ (equilibrium encapsulation constant) (มีหน่วยเป็น M^{-1})

k_i หมายถึง ค่าคงที่ของการนำส่งเข้าสู่เซลล์ (มีหน่วยเป็น $hour^{-1}$)

$k_{deg i}$ หมายถึง ค่าคงที่ของการย่อยสลายที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ (มีหน่วยเป็น $(mg/mL)^{-1} hour^{-1}$)

จากการทดลองได้ค่าคงที่ของการนำส่งแอสตาแซนทินโดยมี liposome เป็นพาหะนำส่งเท่ากับ $0.110 hour^{-1}$ อย่างไรก็ตามยังคงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงอัตราการย่อยสลายของแอสตาแซนทินที่เกิดขึ้นภายในเซลล์และค่าคงที่สมดุลของการบรรจุ จึงจะสามารถสร้างแบบจำลองของกลไกระบบนำส่งแอสตาแซนทินด้วยพาหะนำส่งได้

3.5 การประยุกต์ใช้ระบบนำส่งกับแอสตาแซนทินในการบรรเทาภาวะเครียดออกซิเดชันที่เกิดจากการฉายรังสี

การศึกษาเพื่อประเมินความสามารถของแอสตาแซนทินในพาหะนำส่ง liposome ต่อการบรรเทาภาวะเครียดออกซิเดชันของเซลล์ HepG2 ได้ทำโดยให้เซลล์เกิดภาวะเครียดจากการฉายรังสียูวีเอที่ความยาวคลื่น 368 นาโนเมตร ที่ค่าความเข้มแสงเท่ากับ $0.12 mW/cm^2$ เป็นระยะทาง 7.5 เซนติเมตรเป็นเวลา 120 นาที ในสภาวะการทดสอบต่างๆ ดังต่อไปนี้ คือ สภาวะควบคุม สภาวะบ่มกับสารทดสอบก่อนได้รับความเครียด สภาวะการรับสารทดสอบพร้อมรับความเครียด และสภาวะได้รับสารทดสอบหลังได้รับความเครียด โดยมีการใช้สารละลายแอสตาแซนทิน $10 \mu M$ กับพาหะนำส่ง liposome ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 5% จากนั้นทดสอบความสามารถบรรเทาภาวะเครียดออกซิเดชันของแอสตาแซนทินโดยตรวจวัดปริมาณ lipid peroxide ที่เกิดจากการสันดาปไขมันที่เป็นผลมาจากสารอนุมูลอิสระที่ทำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันด้วย TBARS assay ตามรายละเอียดของการทดลองดังนี้

สภาวะควบคุม

- 1) บ่มเซลล์กับ PBS pH 7.4 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ให้เป็นชุดควบคุม (Cell control)
- 2) บ่มเซลล์กับ PBS pH 7.4 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และเปลี่ยนเป็นสารละลายแอสตาแซนทินที่ปราศจาก liposome บ่มต่อเป็นเวลา 2 ชั่วโมง (Astaxanthin control)
- 3) บ่มเซลล์กับ PBS pH 7.4 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นบ่มเซลล์กับแอสตาแซนทินที่มี liposome เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (Astaxanthin + liposome control)
- 4) บ่มเซลล์กับ PBS pH 7.4 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนฉายรังสีนาน 2 ชั่วโมง (UV treatment)

สภาวะการบ่มเซลล์กับสารทดสอบก่อนได้รับการกระตุ้น

- 5) บ่มเซลล์กับแอสตาแซนทินใน PBS pH 7.4 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนทำการฉายรังสีนาน 2 ชั่วโมง (Astaxanthin before)
- 6) บ่มเซลล์กับแอสตาแซนทินที่มี liposome เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนฉายรังสีนาน 2 ชั่วโมง (Astaxanthin + liposome before)

สภาวะที่เซลล์ได้รับสารทดสอบพร้อมการกระตุ้น

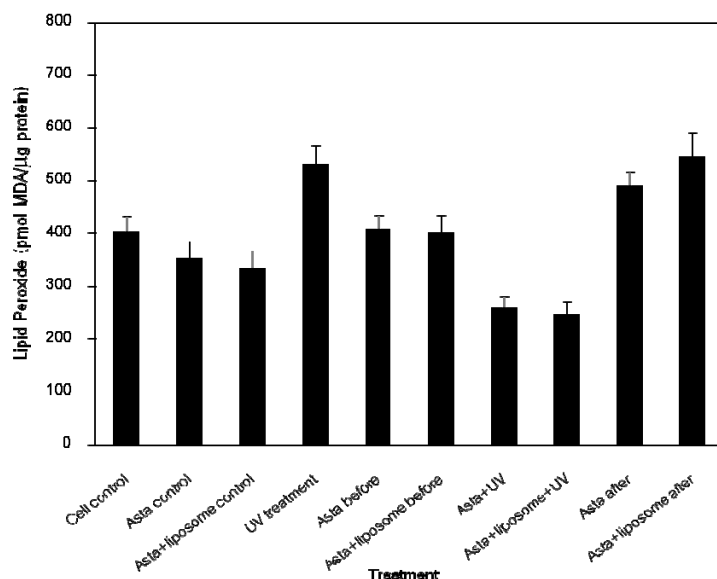
- 7) บ่มเซลล์กับ PBS pH 7.4 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทำการฉายรังสีในสภาวะที่มีแอสตาแซนทินนาน 2 ชั่วโมง (Astaxanthin with UV treatment)
- 8) บ่มเซลล์กับ PBS เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นฉายรังสีที่บ่มร่วมกับแอสตาแซนทินที่มี liposome นาน 2 ชั่วโมง (Astaxanthin + liposome with UV treatment)

สภาวะที่เซลล์ได้รับสารทดสอบหลังได้รับการกระตุ้น

- 9) นำเซลล์ไปฉายรังสี 2 ชั่วโมง ก่อนบ่มกับแอสตาแซนทินเป็นเวลา 2 ชั่วโมง (Astaxanthin after)
- 10) นำเซลล์ไปฉายรังสี 2 ชั่วโมง ก่อนบ่มกับแอสตาแซนทินที่มี liposome เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (Astaxanthin + liposome after)

ผลการทดลองในรูปที่ 32 พบว่าเซลล์ที่บ่มกับแอสตาแซนทินในสภาวะที่มีและปราศจาก liposome ทั้งก่อนและหลังการฉายรังสี สามารถลดการสันดาปของไขมันเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกฉายด้วยรังสีในสภาวะที่ไม่มีแอสตาแซนทินได้ โดยพหุนามาส่งไม่มีผลต่อการต้านภาวะเครียดออกซิเดชันมากนัก ทั้งนี้เนื่องจากใช้ระยะเวลาในการทดสอบก่อนข้างต้น (2 ชั่วโมง) การบ่มเซลล์กับแอสตาแซนทินในสภาวะทดสอบต่างๆ พบว่า แอสตาแซนทินทั้งในรูปอิสระและอยู่ในพหุนามาส่งสามารถบรรเทาความเครียดที่เกิดจาก UV ได้ แต่ไม่สามารถลดภาวะเครียดได้เท่ากับเซลล์ปกติที่ไม่มีการฉายรังสี (สภาวะควบคุม) นอกจากนี้ พบว่าการได้รับแอสตาแซนทินที่ระยะต่างกันจะมีผลต่อการลดภาวะเครียดออกซิเดชันได้ต่างกัน โดยการต้านความเครียดจาก UV จะได้ผลดีที่สุดเมื่อทำการบ่มเซลล์กับแอสตาแซนทินในสภาวะที่มีและปราศจาก liposome พร้อมกับการฉายรังสี หรือได้รับ

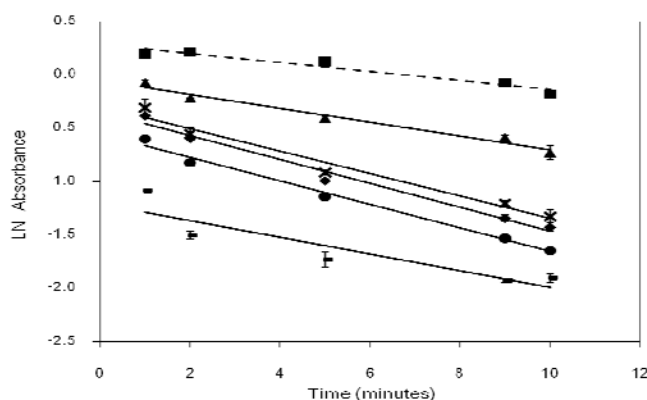
ก่อน แต่การได้รับแอสตาแซนทินภายหลังจะไม่สามารถลดภาวะเครียดจากการฉายรังสีในระดับที่ใช้ในการศึกษานี้ได้



รูปที่ 32 ความสามารถในการบรรเทาภาวะเครียดออกซิเดชันของแอสตาแซนทินและพาหะนำส่ง liposome ต่อเซลล์ HepG2 จากการฉายรังสียูวีเป็นเวลา 120 นาที โดย Cell control บ่มใน PBS, Asta control บ่มกับแอสตาแซนทิน, Asta + liposome control บ่มกับแอสตาแซนทินที่มี liposome, UV treatment เซลล์ที่ได้รับแต่รังสี, Asta before บ่มกับแอสตาแซนทินก่อนการฉายรังสี, Asta + liposome before บ่มกับแอสตาแซนทินก่อนการฉายรังสี, Asta + UV บ่มกับแอสตาแซนทินร่วมกับการฉายรังสี, Asta + liposome + UV บ่มกับแอสตาแซนทินที่มี liposome ร่วมกับการฉายรังสี, Asta after ฉายรังสีก่อนบ่มกับแอสตาแซนทิน และ Asta + liposome after ฉายรังสีก่อนบ่มกับแอสตาแซนทินที่มี liposome

ภายในร่างกายมีกลไกในการป้องกันการเกิดสารอนุมูลอิสระ โดยมีเอนไซม์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสำคัญหลายตัวทำหน้าที่กำจัดสารอนุมูลอิสระที่เกิดจากภาวะเครียดออกซิเดชัน ซึ่งได้แก่ เอนไซม์ catalase, superoxide dismutase และ glutathione peroxidase ในงานวิจัยนี้จึงได้สนใจและเลือกศึกษา กิจกรรมเอนไซม์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้แก่ catalase ซึ่งพบมากในตับและไตที่ภายในมีโครงสร้างเพอร์ออกซิโซม (peroxisome) ทำหน้าที่หั่นเอนไซม์ดังกล่าวมาย่อยหรือกำจัดสารอนุมูลอิสระ hydrogen peroxide (H_2O_2) ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์ให้กลายเป็นโมเลกุลน้ำและออกซิเจน โดยทดสอบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ catalase ด้วยวิธี ferrithiocyanate แปรผันปริมาตรของส่วนที่สกัดได้จากเซลล์เป็น 50, 100, 150, 200 และ 250 ไมโครลิตร กับเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาที่ 1, 2, 5, 9 และ 10 นาที โดยใช้บัฟเฟอร์ 10 mM phosphate pH 7.0 เป็นชุดควบคุม ประเมินการลดลงของสารอนุมูลอิสระ H_2O_2 ที่

ความเข้มข้น 60 mM ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เทียบกับเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา แล้วคำนวณหา
ค่าคงที่ของปฏิกิริยาการลดลงของสารอนุมูลอิสระในหน่วย minute^{-1}



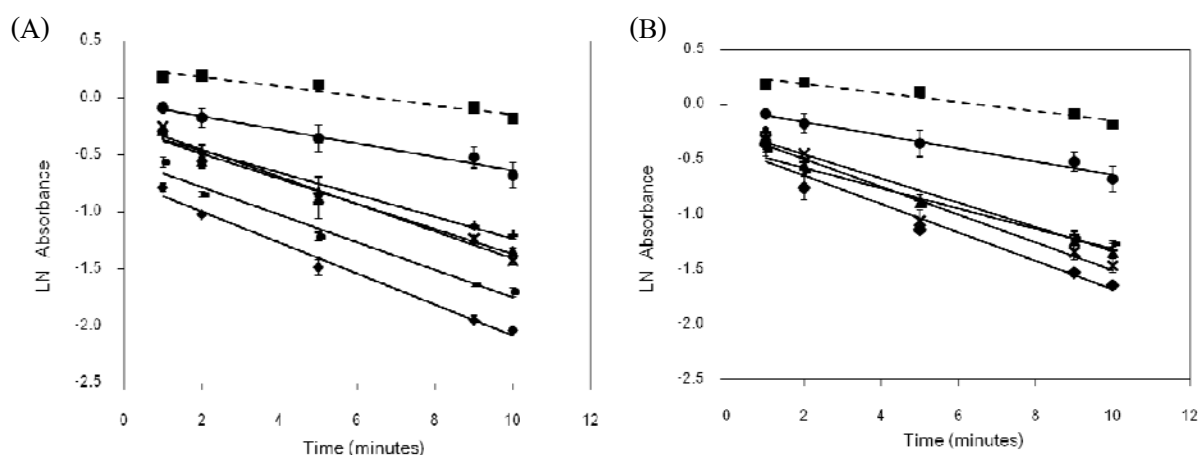
รูปที่ 33 ค่าการทำงานของเอนไซม์ catalase ในการกำจัด H_2O_2 แปรผันปริมาณของส่วนที่สกัดได้จาก
เซลล์ที่ระยะเวลาของปฏิกิริยา 10 นาที โดย (—■—) ชุดควบคุม (phosphate pH 7.0), (—▲—) 50 ไมโครลิตร,
(—x—) 100 ไมโครลิตร, (—◆—) 150 ไมโครลิตร, (—●—) 200 ไมโครลิตร และ (—■—) 250 ไมโครลิตร

ตารางที่ 5 ค่าคงที่ของปฏิกิริยาการลดลงของ H_2O_2 โดยเอนไซม์ catalase ที่อุณหภูมิ 37 °C

Treatment	k (minute^{-1})
Control	0.030
50 μl	0.063
100 μl	0.120
150 μl	0.132
200 μl	0.106
250 μl	0.075

การทดสอบค่าการทำงานของเอนไซม์ catalase โดยแปรผันปริมาณของส่วนที่สกัดจากเซลล์ใน
การกำจัดอนุมูลอิสระ H_2O_2 ผลการทดลองในรูปที่ 5 พบว่าเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น การลดลงของ H_2O_2 มี
ความสัมพันธ์เป็นแบบเชิงเส้นกับระยะเวลาการบ่ม และความสัมพันธ์ดังกล่าวเป็นไปตามหลัก
จลนพลศาสตร์ของปฏิกิริยาอันดับหนึ่ง โดยอัตราการลดลงของสารอนุมูลอิสระสามารถอธิบายด้วย
ค่าคงที่ของปฏิกิริยา แสดงดังตารางที่ 5 ซึ่งพบว่าปริมาณของส่วนที่สกัดได้จากเซลล์เท่ากับ 100
ไมโครลิตร ให้ค่าคงที่ของปฏิกิริยาการลดลงของ H_2O_2 เท่ากับ 0.120 min^{-1} โดยพบว่าปริมาณที่ใช้
ทดสอบในช่วง 50-150 ไมโครลิตร ให้ค่าการทำงานของเอนไซม์เป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณ
ดังนั้น การทดสอบประสิทธิภาพของแอสตาแซนทินร่วมกับพาหะนำส่ง liposome ต่อเซลล์ไลน์ HepG2

ที่ผ่านการฉายรังสีเป็นระยะเวลา 120 นาที ในการวิเคราะห์ค่าการทำงานของเอนไซม์ฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระ catalase จึงใช้ปริมาตรของส่วนที่สกัดได้จากเซลล์เท่ากับ 100 ไมโครลิตร



รูปที่ 34 ค่าการทำงานของเอนไซม์ catalase เมื่อบ่มเซลล์กับแอสตาแซนทินความเข้มข้น 10 μM ในสถานะที่ (A) มี liposome (B) ปราศจาก liposome โดย (---■---) ชุดควบคุม PBS pH 7.4, (---▲---) Cell control บ่มใน PBS pH 7.4, (x) asta control บ่มกับแอสตาแซนทินและ Asta + liposome บ่มกับแอสตาแซนทินที่มี liposome, (---●---) UV treatment เซลล์ที่ได้รับรังสี, (---■---) Asta before บ่มกับแอสตาแซนทินก่อนฉายรังสีและ Asta + liposome before บ่มกับแอสตาแซนทินที่มี liposome ก่อนฉายรังสี, (+) Asta + UV บ่มกับแอสตาแซนทินร่วมกับการฉายรังสีและ Asta + liposome + UV บ่มกับแอสตาแซนทินที่มี liposome ร่วมกับการฉายรังสี, (---◆---) Asta after ฉายรังสีก่อนบ่มกับแอสตาแซนทินและ Asta + liposome after ฉายรังสีก่อนบ่มกับแอสตาแซนทินที่มี liposome

ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 34 เมื่อเวลาเพิ่มขึ้น การลดลงของ H_2O_2 มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับค่าการทำงานของเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้นตามสถานะในการทดสอบ โดยอัตราการลดลงของสารอนุมูลอิสระสามารถอธิบายด้วยค่าคงที่ของปฏิกิริยา (ตารางที่ 6) พบว่าอัตราการลดลงของ H_2O_2 เมื่อบ่มเซลล์กับแอสตาแซนทินในสถานะที่มี liposome ร่วมกับการฉายรังสีมีค่าสูงสุดเท่ากับ 0.155 min^{-1} ในขณะที่เซลล์ในสถานะควบคุมและเซลล์ที่ถูกฉายด้วยรังสีในสถานะที่ไม่มีแอสตาแซนทินมีค่าเท่ากับ 0.109 และ 0.061 min^{-1} ตามลำดับ

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเซลล์ที่ทำการบ่มกับแอสตาแซนทินในสถานะที่มีและปราศจาก liposome ทั้งก่อนและหลัง หรือพร้อมกันกับการฉายรังสี ช่วยส่งเสริม activity ของเอนไซม์ catalase เพิ่มขึ้นได้เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกฉายด้วยรังสีในสถานะที่ไม่มีแอสตาแซนทิน นอกจากนี้การบ่มกับแอสตาแซนทินทั้งในสถานะที่มีและปราศจาก liposome พบว่าแอสตาแซนทินสามารถกำจัดสารอนุมูลอิสระจากภาวะเครียดออกซิเดชันได้ผลดี โดยสถานะที่มี liposome จะให้ผลกำจัดสารอนุมูล

อิสระได้ดีกว่าแอสตาแซนทินอิสระเมื่อพิจารณาจากค่าคงที่ของปฏิกิริยาการลดลงของ H_2O_2 ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าแอสตาแซนทินที่อยู่กับ liposome จะมีความเสถียรกว่า และการปลดปล่อยแอสตาแซนทินได้ช้าๆ จากภายในตำแหน่งของส่วนที่ไม่มีประจุ (hydrophobic) ในชั้น phospholipids ของ liposome จึงทำให้สามารถต้านภาวะเครียดออกซิเดชันได้ดี

ตารางที่ 6. ค่าคงที่ของปฏิกิริยาการลดลงของ H_2O_2 โดยเอนไซม์ catalase ที่อุณหภูมิ 37 °C ในสถานะที่มีและปราศจากพาหะนำส่ง liposome

Treatment	k (minute ⁻¹)
Cell control	0.109
UV treatment	0.061
Asta control	0.204
Asta + liposome control	0.122
Asta before UV	0.107
Asta+UV	0.126
Asta after UV	0.115
Asta + liposome before UV	0.122
Asta + liposome + UV	0.155
Asta + liposome after UV	0.123

สรุป

การกลายพันธุ์ยีสต์เพื่อเพิ่มปริมาณการผลิตแคโรทีนอยด์โดยการกลายพันธุ์ซ้ำๆ ด้วย EMS ที่ความเข้มข้นเพิ่มขึ้น ในลักษณะให้อัตราการรอดของยีสต์หลังการกลายพันธุ์ต่ำๆอยู่ในช่วง 20-40% พบว่าความสามารถได้สายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงขึ้นด้วย EMS จะขึ้นกับสายพันธุ์ดั้งเดิมของยีสต์ โดยพบว่า GM807 สามารถทำการกลายพันธุ์แล้วยังคงโคโลนีสีส้มถึงแดง ในขณะที่ N78 และ FN99 มีสีโคโลนีเป็นสีเหลืองและขาวเมื่อทำการกลายพันธุ์ซ้ำๆ โดยการกลายพันธุ์ยีสต์ GM807 ซ้ำๆ จะไม่สามารถทำให้ยีสต์ผลิตแคโรทีนอยด์สูงขึ้นกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมได้มากนัก (อยู่ในช่วง 1-2 เท่า) และการใช้ β -ionone ในอาหารจะสามารถช่วยคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตแคโรทีนอยด์ได้เด่นชัดขึ้น ซึ่งโคโลนีที่คัดแยกได้จะสามารถผลิตให้ปริมาณแอสตาแซนทินสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม การที่ EMS ไม่สามารถกลายพันธุ์ให้ยีสต์ผลิตแคโรทีนอยด์สูงกว่านี้ได้ อาจเกิดจากข้อจำกัดของประสิทธิภาพ EMS ในการกลายพันธุ์ หรือข้อจำกัดของสายพันธุ์ที่ใช้ อย่างไรก็ตาม การเพิ่มผลผลิตแคโรทีนอยด์ยังสามารถทำได้โดยการใช้อาหารที่เหมาะสม หรือการใช้อาหารราคาถูกที่เป็นวัสดุทางการเกษตร ซึ่งพบว่าทุกสายพันธุ์ของยีสต์กลายพันธุ์สามารถเจริญในอาหารน้ำสับปะรดได้ดีกว่าน้ำมะพร้าว น้ำอ้อย และดีกว่าอาหาร YM ในขณะที่ปริมาณแคโรทีนอยด์ต่อน้ำหนักยีสต์สูงที่สุดใน YM ซึ่งมากกว่าน้ำสับปะรด น้ำมะพร้าว และน้ำอ้อย ตามลำดับ ดังนั้นน้ำสับปะรดจึงเป็นอาหารที่เหมาะสมที่สามารถทำให้เพิ่มมาตรการผลิตแคโรทีนอยด์จากยีสต์ให้สูงขึ้นได้ในราคาไม่แพงเมื่อเทียบกับ YM ยีสต์กลายพันธุ์ที่ได้สามารถเลี้ยงเป็นแหล่งในโตรเจนได้ดี การปรับสัดส่วนของคาร์บอนและไนโตรเจนในน้ำสับปะรดพบว่าสามารถทำให้ยีสต์เจริญให้มวลได้ดีเมื่อมี C:N เป็น 35.6 ขึ้นไป แต่จะผลิตแคโรทีนอยด์ได้ดีเมื่อมี C:N ต่ำกว่าโดยเฉพาะที่ C:N เป็น 24.4

การศึกษาผลของแอสตาแซนทินที่สกัดได้จากยีสต์กับเซลล์มะเร็งชนิด Hela และ HepG2 เทียบกับเซลล์ Vero พบว่าแอสตาแซนทินไม่มีคุณสมบัติในการทำลายเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิดอย่างชัดเจน ในขณะที่สามารถเพิ่มอัตราการเจริญของเซลล์ Vero ได้เป็นสัดส่วนกับปริมาณของแอสตาแซนทินในลักษณะเดียวกันกับที่มีรายงานการศึกษาใน neuronal stem cell (Kim, et al. 2010) การตรวจสอบความสามารถยับยั้งการเจริญเป็นโคโลนีของเซลล์ (clonogenic assay) จากแอสตาแซนทิน พบว่าแอสตาแซนทินอาจมีแนวโน้มเป็นสารยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ถ้าใช้ในระยะยาว การตรวจสอบความสามารถต้านอนุมูลอิสระของแอสตาแซนทินสกัดจากยีสต์ด้วย DPPH assay พบว่าความสามารถต้านอนุมูลอิสระของ Astaxanthin > β -carotene > α -tocopherol > carotenoid extract โดยมี EC50 (Effective dose concentration 50) เป็น 41.99, 119.86, 186.01 และ 248.57 μ M ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม แอสตาแซนทินที่สกัดได้จากยีสต์สามารถลดความเป็นพิษที่เกิดจาก t-BHP ในเซลล์ Vero ได้ดีกว่าเซลล์ Hela ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับ β -carotene แต่ผลจากแอสตาแซนทินจะดีกว่า β -carotene ทั้งนี้อาจเป็นผลจากแอสตาแซน

ทินไปลดภาวะเครียดออกซิเดชันที่เกิดจาก t-BHP ลง โดยการใส่แอสตาแซนทินพร้อมกันกับตัวกระตุ้นจะสามารถช่วยป้องกันภาวะเครียดของเซลล์ได้ดีที่สุด

การปรับปรุงการนำส่งแอสตาแซนทินสู่เซลล์ โดยเลือกตัวทำละลายอินทรีย์ในกลุ่มของพอลิเมอร์ชนิด Lipid-based พบว่าระดับความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ของ tween 80, M β -CD, glycerol และ liposome (0.1% (v/v), 0.2% (w/v) 2% (v/v) และ (0.01-5% (v/v)) เป็นระดับความเข้มข้นที่สามารถใช้เป็นพาหะนำส่งแอสตาแซนทินได้ โดย tween 80 จะเป็นพาหะนำส่งแอสตาแซนทินได้ดีที่สุด แต่มีความไม่เสถียรของแอสตาแซนทินใน tween 80 ดังนั้น liposome และ M β -CD จึงเป็นพาหะนำส่งที่เหมาะสมกว่าโดยให้ค่าคงที่ของการนำส่งเท่ากับ 0.079 และ 0.110 hr⁻¹ ตามลำดับ ในขณะที่สามารถรักษาความเสถียรของแอสตาแซนทินได้ดี การประเมินความสามารถของแอสตาแซนทินในพาหะนำส่ง liposome ต่อการบรรเทาภาวะเครียดออกซิเดชันของเซลล์ HepG2 ที่เกิดจากการฉายรังสียูวีเอที่ความยาวคลื่น 368 นาโนเมตร ที่ค่าความเข้มแสงเท่ากับ 0.12 mW/cm² เป็นเวลา 120 นาที พบว่า แอสตาแซนทินทั้งในรูปอิสระและอยู่ในพาหะ liposome สามารถบรรเทาความเครียดที่เกิดจาก UV ได้ โดยการต้านความเครียดจาก UV จะได้ผลดีที่สุดเมื่อบ่มเซลล์กับแอสตาแซนทิน พร้อมกับการฉายรังสี หรือได้รับก่อน แต่การได้รับแอสตาแซนทินภายหลังจะไม่สามารถลดภาวะเครียดจากการฉายรังสีได้ ส่วนการตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ catalase พบว่าเซลล์ที่ทำการบ่มกับแอสตาแซนทินในสภาวะที่มีและปราศจาก liposome ทั้งก่อนและหลัง หรือพร้อมกันกับการฉายรังสี จะทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ catalase เพิ่มขึ้น ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าแอสตาแซนทินที่อยู่กับ liposome จะมีความเสถียรมากกว่า แล้วปลดปล่อยแอสตาแซนทินได้ช้าๆ ช่วยให้เกิดการต้านภาวะเครียดออกซิเดชันได้ดี

Out put ที่ได้จากโครงการ

ผลงานวิจัยที่ได้ บางส่วนได้นำไปเผยแพร่โดยการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ และนำเสนอในที่ประชุมวิชาการระดับนานาชาติ ส่วนที่เหลือกำลังอยู่ในระหว่างการจัดเตรียมเอกสารเพื่อตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ (ภาคผนวก)

1. Jirasripongpun K.*, Pewlong W., Kitraksa P., Krudngern C. 2008 Carotenoid production by *Xanthophyllomyces dendrorhous*: use of pineapple juice as a production medium. Letters in Applied Microbiology 47: 112–116.
2. Cheeveewattanagul N, Jirasripongpun K, Jirakanjanakit N, Wattanakaroon W*. 2010. Carrier design for astaxanthin delivery. *Adv Mat Res* 93-94: 202-205.

ผลงานวิจัยที่นำเสนอในที่ประชุมวิชาการระดับนานาชาติ (ภาคผนวก)

1. Jirasripongpun K.*, Angkutranon T., Wattanakaroon W., Jirakanjanakit N. Modified DPPH assay for antioxidant capacity determination of astaxanthin. The 22nd Annual Meeting and International Conference of the Thai Society for Biotechnology “TSB2010: Biotechnology for Healthy Living” held from October 20th – 22nd 2010 at Prince of Songkla University, Trang Campus, Trang Province, Thailand.
2. Jirasripongpun K.*, Ringrod P., Piboonsak T., Wattanakaroon W., Jirakanjanakit N. Effect of carbon, nitrogen and oxygen on carotenoid production by *Phaffia rhodozyma*. The 22nd Annual Meeting and International Conference of the Thai Society for Biotechnology “TSB2010: Biotechnology for Healthy Living” held from October 20th – 22nd 2010 at Prince of Songkla University, Trang Campus, Trang Province, Thailand.

เอกสารอ้างอิง

- An GH, Schuman DB, Johnson EA. 1989. Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content. *Appl Environ Microbiol* 55: 116–124.
- Arakane K. 2001. Superior skin protection by astaxanthin. Presentation at the 15th Annual Meeting on Carotenoid Research, September 2001, Toyama, Japan.
- Baier J, Maisch T, Maier M, Landthaler M, Bäumler W. 2007. Direct detection of singlet oxygen generated by UVA irradiation in human cells and skin. *J Invest Dermatol* 127, 1498-1506.
- Chen X, Chen R, Guo Z, Li C, Li P. 2007 The preparation and stability of the inclusion complex of astaxanthin with β -cyclodextrin. *Food Chem* 101, 1580-1584.
- Chitchumroonchokchai C, Bomser JA, Gamm JE, Failla ML. 2004. Xanthophylls and α -tocopherol decrease UVB-induced lipid peroxidation and stress signaling in human lens epithelial cells. *J Nutr* 134, 3225-3232.
- Cohen G., Kim M. and Ogwu V. 1996. A modified catalase assay suitable for a plate reader and for the analysis of brain cell cultures. *J Neurosci Methods* 7, 53-56.
- Denson T.B. and Wirtz K.W.A. 2001 The peroxisome in oxidative stress. *IUBMB Life* 51, 223–230.
- Domínguez-Bocanegra A R, Torres-Muñoz J A. 2004. Astaxanthin hyperproduction by *Phaffia rhodozyma* (now *Xanthophyllomyces dendrorhous*) with raw coconut milk as sole source of energy. *Appl Microbiol Biotechnol* 66: 249–252.
- Dubuisson ML, de Wergifosse B, Trouet A, Baguet F, Marchand-Brynaert J, Rees JF. 2000. Antioxidative properties of natural coelenterazine and synthetic methyl coelenterazine in rat hepatocytes subjected to tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress. *Biochem Pharmacol* 60: 471-478.
- FloreÂncio JA, Soccol CR, Furlanetto LF, Bonfim TMB, Krieger N, Baron M, Fontana JD. 1998. A factorial approach for a sugarcane juice-based low cost culture medium: increasing the astaxanthin production by the red yeast *Phaffia rhodozyma*. *Biopro Engineer* 19: 161-164.
- Jirasripongpun K, Pewlong W, Kittraksa P, Krudngern C. 2008. Carotenoid production by *Xanthophyllomyces dendrorhous*: use of pineapple juice as a production medium. *Let Appl Microbiol* 47: 112–116.
- Johnson EA, Schreiber D, Kwok P, William T, Yang H, Geldiay-Tuncer B. Processes for in vivo production of astaxanthin and *Phaffia rhodozyma* yeast of enhanced astaxanthin content. United States Patent: Document no. 5182208.

- Lewis MJ, Ragot N, Berlant MC, Miranda, M. 1990. Selection of Astaxanthin-Overproducing Mutants of *Phaffia rhodozyma* with β -Ionone. *Appl Environ Microbiol* 56: 2944-2945.
- Huang D, Ou B, Prior RL. 2005. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J Agr Food Chem*. 53: 1841-1856.
- Kim JH, Nama SW, Kim BW, Kim WJ, Choi YH. 2010. Astaxanthin improves the proliferative capacity as well as the osteogenic and adipogenic differentiation potential in neural stem cells. *Food Chem Toxicol* 48: 1741–1745.
- Lancrajan I., Diehl H.A., Socaciu C., Engelke M. and Zorn-Kruppa M. 2001 Carotenoid incorporation into natural membranes from artificial carriers: liposomes and β -cyclodextrins. *Chem Phys Lipids* 112, 1–10
- Liu X, Osawa T. 2007. Cis astaxanthin and especially 9-cis astaxanthin exhibits a higher antioxidant activity in vitro compared to the all-trans isomer. *Biochem Biophys Res Com* 357: 187–193.
- Liu D, Shi J, Ibarra AC, Kakuda Y, Xue SJ. 2008. The scavenging capacity and synergistic effects of lycopene, vitamin E, vitamin C, and β -carotene mixtures on the DPPH free radical. *LWT-Food Sci Tech*. 41: 1344–1349.
- Miki W. 1991. Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure Appl Chem* 63: 141-146.
- Mayne ST. 1996. Beta-carotene, carotenoids and disease prevention in humans. *FASEB J* 10:690–701.
- Naguib YMA. 2000. Antioxidant Activities of Astaxanthin and Related Carotenoids. *J Agr Food Chem* 48: 1150-1154.
- Nicole M, Lyons NM, O'Brien NM. 2002. Modulatory effects of an algal extract containing astaxanthin on UVA-irradiated cells in culture. *J Dermatol Sci* 30, 73-84.
- O'Conor I, O'Brien N. 1998. Modulation of UVA light-induced oxidative stress by beta-carotene, lutein and astaxanthin in cultured fibroblasts. *J Dermatol Sci* 16, 226-230.
- Sandesh Kamath B, Vidhyavathi R, Sarada R, Ravishankar GA. 2008. Enhancement of carotenoids by mutation and stress induced carotenogenic genes in *Haematococcus pluvialis* mutants. *Bioresource Technol* 99: 8667–8673.
- Sun N, Lee S, Song KB. 2004. Characterization of a carotenoid-hyperproducing yeast mutant isolated by low-dose gamma irradiation. *Inter. J. Food Microbiol*. 94: 263-267.
- Visser H, van Ooyen A JJ, Verdoes JC. 2003. Metabolic engineering of the astaxanthin-biosynthetic pathway of *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *FEMS Yeast Research* 4: 221-231.

ภาคผนวก

ORIGINAL ARTICLE

Carotenoid production by *Xanthophyllomyces dendrorhous*: use of pineapple juice as a production medium

K. Jirasripongpun¹, W. Pewlong², P. Kitraksa¹ and C. Krudngern¹

¹ Department of Biotechnology, Faculty of Engineering and Industrial Technology, Silpakorn University, Nakornpathom, Thailand

² The Office of Atoms for Peace, Chatuchak, Bangkok, Thailand

Keywords

astaxanthin, carotenoid, mutant, pineapple, *Xanthophyllomyces dendrorhous*.

Correspondence

Kalyanee Jirasripongpun, Department of Biotechnology, Faculty of Engineering and Industrial Technology, Silpakorn University, Nakornpathom 73000, Thailand.

E-mail: kalyanee@su.ac.th

2007/0800: received 23 May 2007, revised 3 April 2008 and accepted 17 April 2008

doi:10.1111/j.1472-765X.2008.02396.x

Abstract

Aims: To select a carotenoid-hyperproducing mutant and to formulate pineapple juice as a carotenoid production medium.

Methods and Results: Yeast strain of *Xanthophyllomyces dendrorhous* mutant GM 807 (derived from gamma irradiation) and the mutant n78 (from neutron irradiation) were selected based on higher carotenoid production in diluted pineapple juice as a medium. The selected strain was evaluated under various concentrations of pineapple juice. The results obtained in the study demonstrate that the mutant GM 807 enhanced production by 65.8% when using pineapple juice as medium at 10% dilution in place of yeast malt medium.

Conclusion: Pineapple juice could be used as a sole medium for carotenoid production.

Significance and Impact of the Study: Our results provide useful information for the design of production media for carotenoids to be used in various applications.

Introduction

Astaxanthin is an orange-pink carotenoid pigment that gives the characteristic colouration to some birds, crustaceans and salmon (Johnson *et al.* 1980). Its wide use as a functional food and pharmaceutical supplement (Fang and Wang 2002) enhances the demand for astaxanthin production. *Xanthophyllomyces dendrorhous* (formerly known as *Phaffia rhodozyma*) is an excellent astaxanthin-producing yeast which has been regarded as a potential source for the biotechnological production of dietary astaxanthin (Cruz and Parajó 1998). Improved carotenoid production by combined strategies of using a carotenoid-hyperproducing mutant and low-cost-based fermentation media makes industrial carotenoid production feasible (Fang and Cheng 1993; An *et al.* 2001). A number of researchers have investigated carotenoid production from agricultural waste (Cruz and Parajó 1998; Aksu and Tuğba Eren 2005) and cheap industrial by-products (An *et al.* 2001). However, the use of pineapple juice as a culture medium for carotenoid production has not been reported.

Xanthophyllomyces dendrorhous is capable of utilizing a variety of carbon sources for growth and carotenoid

production; for example, glucose, cellobiose, maltose, sucrose, lactose, xylose and arabinose (Johnson and An 1991; Fang and Cheng 1993; Parajó *et al.* 1998). The optimal pH for growth and astaxanthin formation is at 5.0 (An *et al.* 1996; Hu *et al.* 2006). Out of the reported agricultural and industrial waste available in Thailand, such as molasses, whey and pineapple, pineapple is an attractive source for the medium of carotenoid production because it contains utilizable carbon source and acidic pH. In this study, *X. dendrorhous* mutant GM807 and mutant n78 were selected based on growth ability and higher carotenoid production in pineapple juice medium. Optimal conditions for carotenoid production of the selected strain were evaluated on pineapple juice concentrations. In addition, H₂O₂, a stimulant for carotenoid biosynthesis, was also investigated.

Materials and methods

Materials

Remnants from freshly cut pineapples, including their cores, were collected, washed and blended. The filtered

juice was boiled, centrifuged and sterilized by autoclaving before being used as a culture medium. The juice contained total soluble solid at 22.5° Brix and the pH was at 4.0.

Micro-organisms and culture conditions

Highly pigmented strains of *X. dendrorhous* mutant GM807 (derived from gamma irradiation) and *X. dendrorhous* mutant n78 (from neutron irradiation) were gifts from The Office of Atoms for Peace, Bangkok, Thailand. Yeast malt (YM) agar medium, which contained the following components per litre: yeast extract, 3 g; malt extract, 3 g; peptone, 5 g; glucose, 10 g; and agar 20 g, was used to maintain the yeast strains. They were at one passage adapted to 10% (v/v) pineapple juice medium before used as seeds for all the experiments at a ratio of 10% (v/v).

Strain selection and optimum conditions for carotenoid production

Xanthophyllomyces dendrorhous mutant GM807 and n78 were grown in 250-ml Erlenmeyer's flask containing 50 ml of 10% (v/v) pineapple juice medium for 10 days at 22°C in an orbital incubator shaker at 175 strokes per min. The strain that grew well and produced a higher carotenoid content was selected for further study.

Pineapple juice concentrations were varied at 2%, 5%, 10%, 15%, 25% and 50% (v/v) in order to determine the appropriate pineapple juice concentration for carotenoid production, compared with YM broth. The selected pineapple juice concentration was then used to study the effect of H₂O₂ at 5, 10 and 20 mmol l⁻¹, which was added after 24 h of cultivation in order to examine its capacity to enhance carotenoid production of the yeast. All experiments were performed in triplicate under 6-day cultivation.

Analytical methods

The total sugar and reducing sugar of pineapple juice were measured using the Phenol-sulfuric method (Dubois *et al.* 1956) and the 3,5-dinitrosalicylate method (Miller 1959), respectively. Cell concentration was determined based on dry cell weight (DCW). The carotenoid content of yeast was determined according to An *et al.* (1996) by disrupting the cell with glass beads in 1 ml of dimethyl sulfoxide (DMSO). The astaxanthin was extracted from lysed cells using 3 ml of acetone-saturated NaCl and petroleum ether solution; 1 : 1 : 1 v/v/v. The upper layer of petroleum ether was collected and measured at 474 nm. The total carotenoid was calculated using the following formula:

1% extinction coefficient = 2100 by the formula:

$$\frac{(\text{ml of petroleum ether})(A_{474})(100)}{(21)(\text{yeast dry weight})}$$

All the sampling were carried out in triplicate, and their average total carotenoid was determined.

Statistical analysis

The data were analysed by one-way analysis of variance (ANOVA). Differences among treatments were examined for the level of significance by Duncan's multiple range tests.

Results

Characterization of pineapple juice

The juice extracted from pineapple waste was analysed. The pH was 4.0 and the total soluble solid was 22.5° Brix. The total sugar and reducing sugar were 149.44 and 54.71 g l⁻¹, respectively.

Strain selection for carotenoid production in diluted pineapple juice

Time courses of biomass and total carotenoid content (Fig. 1) showed that both mutants (*X. dendrorhous* mutant GM807 and *X. dendrorhous* mutant n78) grew rapidly in the first 2 days after inoculation, and then cell weight slightly decreased and remained in a stationary phase in the later days with little change. The mutant GM807 grew more slowly than the mutant n78 and resulted in a lower amount of cell weight. The carotenoid formation was observed simultaneously at the beginning of cell

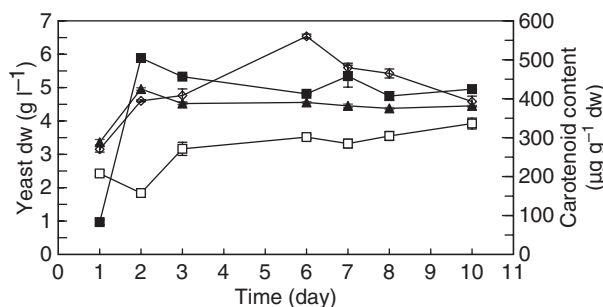


Figure 1 Carotenoid content of *Xanthophyllomyces dendrorhous* mutant GM807 (○) *X. dendrorhous* mutant n78 (●) and growth of mutant GM807 (□) mutant n78 (■) in 10% (v/v) diluted pineapple juice culture incubated in 22°C rotary shaking incubator at 175 rev min⁻¹ for 10 days.

Pineapple juice concentration % (v/v)	Yeast dry weight (g l ⁻¹)	Carotenoid content (μg g ⁻¹)	Initial reducing sugar (g l ⁻¹)	Residual reducing sugar (g l ⁻¹)
2	1.693 ± 0.048*	330.68 ± 12.756**	1.09	0.02
5	3.350 ± 0.015†	329.90 ± 4.345†**	2.74	0.10
10	5.483 ± 0.032‡	493.84 ± 12.956§	5.47	0.20
15	6.957 ± 0.010§	395.66 ± 13.806‡	8.21	0.44
25	8.923 ± 0.987¶	308.84 ± 6.630†**	13.68	0.41
50	9.053 ± 0.026¶	47.70 ± 2.572*	27.35	2.23
YM medium	3.517 ± 0.017**	297.83 ± 10.698†	10.00	0.38

YM, yeast malt.

*, †, ‡, §, ¶ and ** represent significant difference at $P < 0.05$ for comparison in each column.

growth and continued through the stationary phase. Carotenoid content of the mutant GM 807 was higher than that of the mutant n78 through all the cultivation period. Its highest carotenoid content in a 6-day culture was at $560.28 \pm 5.606 \mu\text{g g}^{-1}$, while that of the mutant n78 was at $336 \pm 8.617 \mu\text{g g}^{-1}$ after growing in a longer period of 10 days.

Culture conditions for carotenoid production

The influence of pineapple juice concentrations to biomass of *X. dendrorhous* mutant GM 807 (Table 1) showed that biomass was enhanced with the increasing concentration of pineapple juice or the initial reducing sugar. The reducing sugar was almost totally consumed by the yeasts during a 6-day culture to less than 0.5 g l^{-1} at all tested concentrations of the pineapple juice, except for the 50% (v/v), which showed that the residual reducing sugar still remained at 2.2 g l^{-1} . Carotenoid content was enhanced with the increasing pineapple juice concentration to the maximum at 10% (v/v), after which the carotenoid content decreased. The 10% (v/v) supported the highest carotenoid formation at 65.8% higher than that of YM.

Although the H_2O_2 concentrations of H_2O_2 at 10 and 20 mmol l^{-1} suppressed cell growth, they enhanced carotenoid production at about 5–7% higher than that of the

control (Table 2). Thus, H_2O_2 concentration did not produce a significantly higher yield of carotenoid.

Discussion

The juice extracted from pineapple waste provided higher total soluble solids (22.5° Brix) than that of freshly prepared juice (12.5–15.5° Brix) as reported by Joomwong and Sorsrivichai (2005). This higher total soluble solid may result by the heat during juice preparation. The sugars – sucrose, glucose and fructose – in pineapple juice were good substrates for growth and carotenoid formation of both *X. dendrorhous* mutant GM807 and the mutant n-78. The pH at 4 of pineapple medium was also suitable for carotenoid production than the pH 6 of the YM medium. However, the mutant GM807 was selected for the study because of its faster growth and higher level of carotenoid production.

Increasing pineapple juice concentration provided higher content of reducing sugar for growth. Yeast dry weight was increased in relation with the initial reducing sugar. However, the amount of carotenoid formation by the yeast did not correlate with the initially available total reducing sugar; the optimum concentration for carotenoid formation was at 5.47 g l^{-1} , whereas concentration at 27.35 g l^{-1} significantly suppressed it. This was probably the result of the inhibitory effect of high concentration of sugar as reported by Johnson and Lewis (1979) that carotenoid formation in *P. rhodozyma* was decreased by a glucose concentration higher than 15 g l^{-1} . In addition, the lower carotenoid formation in pineapple juice medium at the concentration beyond 10% (v/v) might have resulted from oxygen limitation owing to the growth of yeast, which was supported by the report of Liu *et al.* (2006).

Parajó *et al.* (1998) demonstrated that the pigmentation of *Phaffia* strain was enhanced by inorganic nitrogen supplementation. However, the presence of nitrogen either from organic or inorganic sources at 5 g l^{-1} did

Table 2 Effect of H_2O_2 on growth and carotenoid production of *Xanthophyllomyces dendrorhous* mutant GM807 in 10% (v/v) pineapple juice

H_2O_2 (mmol l ⁻¹)	Cell weight (g l ⁻¹)	Carotenoid content (μg g ⁻¹)
5	4.825 ± 0.02217*†	416.33 ± 14.12922‡
10	4.673 ± 0.13231**‡	479.08 ± 7.10525*
20	4.578 ± 0.03728‡	487.53 ± 27.24563*
Control	4.843 ± 0.03816†	456.80 ± 3.46142*‡

*, † and ‡ represent significant differences at $P < 0.05$ for comparison in each column.

not significantly enhance cell growth or carotenoid formation in this study (data not shown). It is possible that proteins and vitamins present in the juice as source of nitrogen (<http://herbal-medicine.philsite.net/pineapple.htm>) were sufficient for growth. The additional nitrogen could have caused inappropriate C/N ratio in the medium under the condition of study. Therefore, pineapple juice tended to be a good medium without any nitrogen supplementation at the study condition.

Liu and Wu (2006) reported that astaxanthin production of *X. dendrorhous* was significantly increased to 53.52–67.60% higher than that of the control if the cell at 24 h was treated with 10–20 mmol l⁻¹ H₂O₂. In this study, only 5–7% of carotenoid was increased. Moreover, the increasing concentration of H₂O₂ resulted in slightly lower cell weight. This was most likely the result of the toxicity of H₂O₂ as reported by Liu and Wu (2006). The reduced effect of H₂O₂ on carotenoid formation in this study might be affected by the presence of antioxidant or ascorbic acid in pineapple juice (Sun et al. 2002). It may neutralize the oxidative stress of H₂O₂ and result in an insignificant increase of carotenoid content.

Pineapple juice used in this study was elicited from waste, and the optimal concentration used as a culture medium was only a small amount at 10% (v/v). While YM medium is rather expensive (costs US\$80.5 per 500 g), it provided less carotenoid content than the diluted pineapple juice. The acidic pH at 4.0 of pineapple juice was also suitable for growth and carotenoid formation without any pH treatment. The nutrient composition of pineapple juice listed smaller amounts of several other ingredients, such as minerals (Ca, Na, K, Fe, Mg, P), proteins, vitamins (A, B, C, E, K) niacin and folate. This emphasized that pineapple juice could possibly be used as a suitable medium for *X. dendrorhous* without any supplementation. Moreover, it was reported that pineapple juice contains beta-carotene (Morgan 1966) which could be used as intermediates or precursors for astaxanthin production by the yeast as reported by Liu and Wu (2006). Therefore, pineapple juice is a cheap and satisfactory medium for carotenoid production by *X. dendrorhous* mutant GM 807 without the necessity of supplementary nitrogen sources or reactive oxygen species agents. This would make the use of pineapple juice a feasible and an economical culture medium for mass production at the industrial scale.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the Office of Atoms for Peace, Thailand, for providing *X. dendrorhous* mutant GM807 and mutant n78. Thanks to Dr Nuananong Jirakanjanakit

for statistical analysis and reviewing this manuscript. Thanks also to Dr Alastair Hayton-Williams, a visiting Professor at the Faculty of Art, Department of English for kindly help in English correction. This research study was partly supported by The Thailand Research Fund.

References

- Aksu, Z. and Tuğba Eren, A. (2005) Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: use of agricultural wastes as a carbon source. *Process Biochem* **40**, 2985–2991.
- An, G.H., Kim, C.H., Choi, E.S. and Rhee, S.K. (1996) Medium optimization for cultivation of carotenoid hyperproducing *Phaffia rhodozyma* Mutant HT-5FO1C. *J Ferment Bioeng* **82**, 515–518.
- An, G.H., Jang, B.G. and Cho, M.H. (2001) Cultivation of the carotenoid-hyperproducing mutant 2A2N of the red yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) with molasses. *J Biosci Bioeng* **92**, 121–125.
- Cruz, J.M. and Parajó, J.C. (1998) Improved astaxanthin production by *Xanthophyllomyces dendrorhous* growing on enzymatic wood hydrolysates containing glucose and cellobiose. *Food Chem* **63**, 479–484.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal Chem* **28**, 350–356.
- Fang, T.J. and Cheng, Y. (1993) Improvement of astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* through mutation and optimization of culture conditions. *J Ferment Bioeng* **75**, 466–469.
- Fang, T.J. and Wang, J.M. (2002) Extractability of astaxanthin in a mixed culture of a carotenoid over-producing mutant of *Xanthophyllomyces dendrorhous* and *Bacillus circulans* in two-stage batch fermentation. *Process Biochem* **37**, 1235–1245.
- Hu, Z.C., Zheng, Y.G., Wang, Z. and Shen, Y.C. (2006) pH control strategy in astaxanthin fermentation bioprocess by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Enzyme Microb Technol* **39**, 586–590.
- Johnson, E.A. and An, G.H. (1991) Astaxanthin from microbial sources. *Crit Rev Biotechnol* **11**, 297–326.
- Johnson, E.A. and Lewis, M.J. (1979) Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*. *J Gen Microbiol* **115**, 173–183.
- Johnson, E.A., Villa, T.G. and Lewis, M.J. (1980) *Phaffia rhodozyma* as an astaxanthin source in salmonid diets. *Aquaculture* **20**, 123–134.
- Joomwong, A. and Sorsrivichai, J. (2005) Morphological characteristic, chemical composition and sensory quality of pineapple fruit in different seasons. *CMU J* **4**, 149–164.
- Liu, Y.S. and Wu, J.Y. (2006) Hydrogen peroxide-induced astaxanthin biosynthesis and catalase activity in *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Appl Microbiol Biotechnol* **73**, 663–668.
- Liu, Y.S., Wu, J.Y. and Ho, K.P. (2006) Characterization of oxygen transfer conditions and their effects on *Phaffia*

- rhodozyma* growth and carotenoid production in shake-flask cultures. *Biochem Eng J* **27**, 331–335.
- Miller, G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* **31**, 426–428.
- Morgan, R.C. (1966) Chemical studies on concentrated pineapple juice 1. Carotenoid composition of fresh pineapples. *J Food Sci* **31**, 213.
- Parajó, J.C., Santos, V. and Vázquez, M. (1998) Optimization of carotenoid production by *Phaffia rhodozyma* cells grown on xylose. *Process Biochem* **33**, 181–187.
- Sun, J., Chu, Y.F., Wu, X. and Liu, R.H. (2002) Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *J Agric Food Chem* **40**, 7449–7454.

Carrier Design for Astaxanthin Delivery

Nopchulee Cheeveewattanagul¹, Kalyanee Jirasripongpun¹, Nuananong Jirakanjanakit² and Wanida Wattanakaroon^{1, a}

¹Department of Biotechnology, Faculty of Engineering and Industrial Technology,
Silpakorn University, Nakhon Pathom, 73000 Thailand

²Institute of Molecular Bioscience, Mahidol University, Salaya, Nakhon Pathom, 73170 Thailand

^aCorresponding Author: wanida@su.ac.th

Keywords: Antioxidant; Carrier design; Delivery

Abstract. Astaxanthin is a natural carotenoid pigment with powerful antioxidant capacity which has been reported for beneficial effects on human health to prevent cancers and anti-degenerative diseases. Bioavailability of astaxanthin is however limited due to insoluble and instable properties of its lipophilic nature. This study describes the cytotoxicity and astaxanthin delivery using a surfactant (tween 80) and penetration enhancers (methyl β -cyclodextrin and liposome) to enhance astaxanthin bioavailability in human hepatocellular carcinoma cell line. Toxicity of tween 80 and methyl β -cyclodextrin increased with concentration. Liposome did not alter cell viability relative to untreated controls, regardless of concentration tested. Cellular uptake among delivery vehicles was compared at 24 hours and was found to be higher than that of astaxanthin without a vehicle. The cellular uptake rate was highest when liposome was used as the delivery vehicle. This finding aids in the development of design criteria for vehicles for delivery of antioxidants to cells.

Introduction

Astaxanthin is the carotenoid of xanthophyll class that has been used in food diet and feed industries. It is structurally similar to β -carotene with additional hydroxyl and keto groups. Astaxanthin has potential health benefits from its superior antioxidant capacity compared to those of vitamin E and β -carotene. Several studies have reported the efficacy of astaxanthin for prevention against cancers, anti-inflammation, and anti-degenerative diseases [1-3]. However, the bioavailability of astaxanthin is low due to insoluble and instable properties of its lipophilic nature. This could limit its use as a potential antioxidant in human. A number of studies have investigated the use of surfactants and penetration enhancers to enhance the bioavailability of various lipophilic compounds to cells in culture [4-9]. Information on the comparison of delivery vehicles for astaxanthin uptake; however, seems limited. We, therefore, evaluated different structural materials for the delivery of this high value antioxidant. The cytotoxicity as well as cellular uptake efficiency was measured in this study using human hepatocellular carcinoma cell line.

Materials and Methods

Chemicals. Astaxanthin was purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Methyl β -cyclodextrin (M β -CD) and tween 80 were purchased from Aldrich (Milwaukee, WI, USA). Liposome was obtained from Nikko Chemicals (Tokyo, Japan). Cell culture reagents were purchased from Gibco BRL (Grand Island, NY, USA).

Cell culture. Human HepG2 carcinoma cells were cultured in a humidified 5% (v/v) CO₂/air environment at 37°C in MEM medium supplemented with 10% (v/v) FBS.

Toxicity of carriers. Toxicity of carriers was determined by the MTT reduction assay [10]. Cells were plated at density 2×10^4 cells/well in 96 well plates and grown at approximately 60% confluence cells. The surfactant (tween 80) or penetration enhancers (M β -CD or liposome) were

incubated with the cells for 24 and 48 hours, after which time the culture medium was removed and cells were washed with PBS (0.8 g/L NaCl, 0.2 g/L KCl, 1.25 g/L Na₂HPO₄, 0.2 g/L KH₂PO₄, pH 7.4). MTT was added to each well to yield a final MTT concentration of 0.5 mg/mL. Cells were incubated with the MTT for 4 hours in a CO₂ incubator after which time 100 μ L of DMSO was added to dissolve the formed formazan crystals. The results were then read using a TECAN microplate reader at 560 nm (Männedorf, Switzerland). Viability was reported relative to control cells unexposed to the carriers.

Preparation of astaxanthin-loaded carriers. Tween 80, M β -CD and liposome were used as delivery vehicles in our study. Astaxanthin-tween 80 complex was prepared as previously described by O'Sullivan et al. [7]. A stock solution of 100-fold μ M of astaxanthin dissolved in THF was mixed with tween 80 (10 mL/L in acetone) in a volume ratio of 1:1. The complex mixture was dried under N₂ and reconstituted in MEM medium to give a final concentration of tween 80 of 0.1 mL/L. Astaxanthin-loaded M β -CD or liposome was prepared as modified from Pfitzner et al. [5]. Briefly, a stock solution of 100-fold μ M of astaxanthin dissolved in DMSO was added to the vehicle dissolved in MEM medium to give a final concentration of M β -CD or liposome of 2 mg/mL or 50 mL/L, respectively. All vehicles contained astaxanthin at a final concentration of 10 μ M.

Cellular uptake of astaxanthin. Cellular uptake was based on the method which was reported by O'Sullivan et al. [11]. Cells were plated at density 2×10^5 cells/mL in a 58 mm petri-dish and grown at approximately 80% confluence cells (10^6 cells/dish). The culture medium was replaced with MEM medium containing an astaxanthin-loaded vehicle, and cells were then incubated for the indicated times in the dark. For measurement of astaxanthin uptake, cells were trypsinized and resuspended with 1 mL of PBS, and then extracted twice with 2 mL of hexane: ethanol: acetone (50:25:25, v/v). The mixture was centrifuged at 1200g (4°C) for 10 minutes and extracted astaxanthin was dried under N₂ in the dark and resuspended with 0.5 mL of dichloromethane: methanol (25:75, v/v). Astaxanthin was identified by a reversed-phase HPLC system with detection at 480 nm (Waters, Milford, MA) using a RP-18 column (Merck, Darmstadt) [12]. The concentration of astaxanthin was then quantified by the peak area in the chromatogram comparing with standard reference curves. The astaxanthin uptake was assumed to be first order, and the reaction rate constant (k , hour⁻¹) was calculated.

Results and Discussion

Toxicity of carriers. The toxicity of carriers was determined as a function of concentration. The data were reported as the fraction of the viability of the cells treated with the carriers for 24 and 48 hours relative to the viability of control cells unexposed to the carriers. As seen in Figures 1A and 1B, toxicity of tween 80 and M β -CD increased with concentration. Conversely, the liposome did not alter cell viability relative to untreated controls, regardless of concentration tested (Figure 1C). Studies by O'Sullivan et al. [7] have indicated that *in vitro* toxicity of tween 80 appears to be concentration dependent. Pfitzner et al. [5] examined the cytotoxicity of M β -CD in human skin fibroblast cell line via LDH assay, and suggested that M β -CD at a concentration of 0.2% were not toxic after 24 and 48 hours of exposure. In our toxicity experiment, we found that exposure to the tween 80 and M β -CD above concentrations of 0.1% (v/v) and 0.2% (w/v), respectively, resulted in cell toxicity, in accord with the above findings.

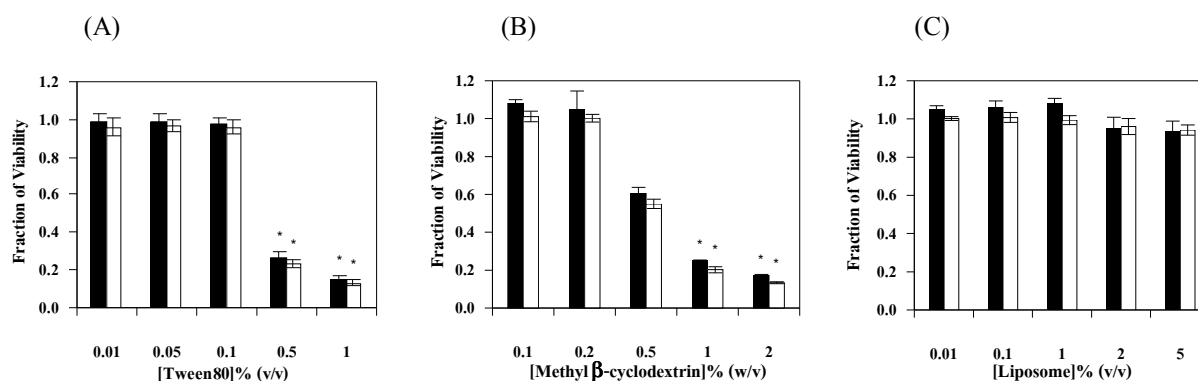


Figure 1. Carrier toxicity experiment. The data are reported as the fraction of the viability of the cells incubated with (A) tween 80, (B) M β -CD and (C) liposome for 24 (solid bars) and 48 hours (open bars) relative to the viability of control cells unexposed to the carriers. The mean $\pm$ standard deviation of 6 determinations are presented. * indicates measurement is significantly different than for control cells ($p < 0.05$).

Cellular uptake of astaxanthin. The uptake of astaxanthin carrier complex was monitored as a function of time (Figure 2). The data was reported as the amount of complexes delivered per 10^6 cells. Cellular uptake among delivery vehicles was compared at 24 hours and was found to be higher than that of astaxanthin without a vehicle. More complex prepared with liposome was found to be taken up by cells when compared to M β -CD or tween 80. We assumed that uptake was first order. As can be seen in Table 1, the cellular uptake rate was highest for liposome, then M β -CD relative to tween 80, 0.110, 0.079 and 0.025 hour^{-1} , respectively.

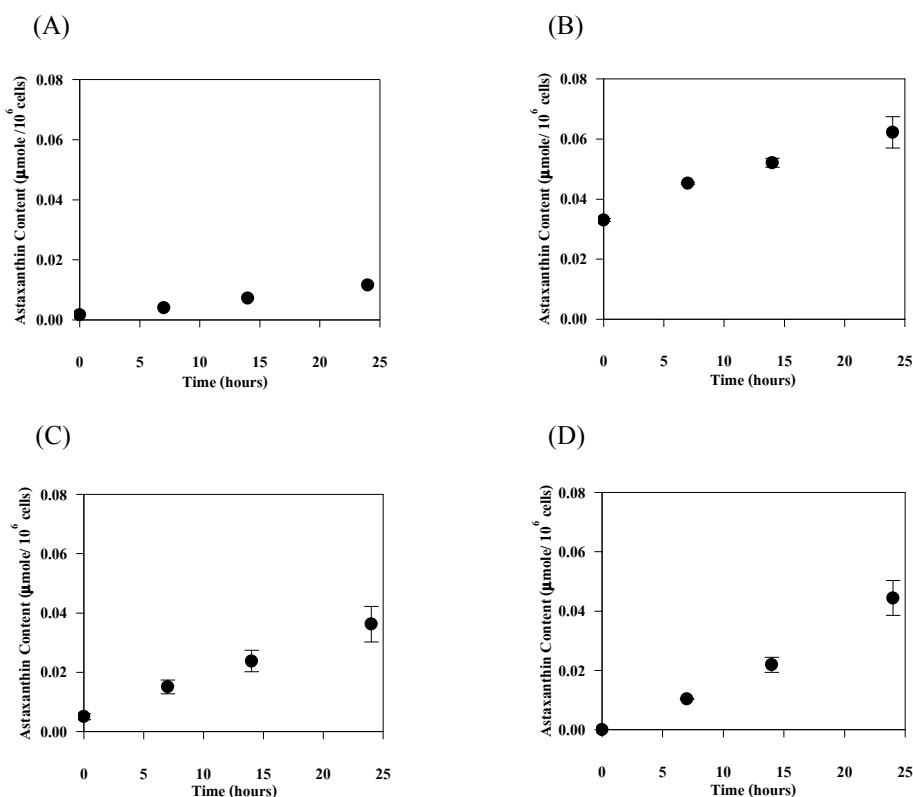


Figure 2. Time course of astaxanthin uptake to cells as a function of carriers. Cells were treated with the carrier at 37°C for varying periods of time. The mean $\pm$ standard deviation from 3 to 6 replicates are shown. The amount of astaxanthin per 10^6 cells is plotted for (A) no vehicle, (B) tween 80, (C) M β -CD, and (D) liposome.

Table 1. Summary of model parameters obtained in cellular uptake experiment.

Vehicle	k [hour ⁻¹]
no vehicle	0.078
tween 80	0.025
M β -CD	0.079
liposome	0.110

This might be that liposome is bound and endocytosed to the cells [15]. Note that the astaxanthin content was detected in the cells at initial times of incubation reaching an apparent saturation after 7-14 hours when tween 80 was used as the delivery vehicle. Tween 80 increases the liquid pools within the membrane [13]. However, its high viscosity due to phospholipid contents could result in lower uptake rate [14]. This study enables the establishment of effective delivery methods to enhance astaxanthin bioavailability.

References

- [1] M. Guerin, M.E. Huntley and M. Olaizola: Trends Biotechnol. Vol. 21 (2003), p. 210–217
- [2] W. Miki: Pure Appl. Chem. Vol. 63 (1991), p. 141–146
- [3] R.T. Lorenz and G.R. Cysewski: Trends Biotechnol. Vol. 18 (2000), p. 160-167
- [4] S.F. Lockwood, S. O'Malley and G.L. Mosher: J. Pharm. Sci. Vol. 92 (2003), p. 922-926
- [5] I. Pfitzner, P.I. Francz and H.K. Biesalski: Biochim. Biophys. Acta Vol. 1474 (2000), p. 163-168
- [6] C. Yuan, Z. Jin, X. Xu, H. Zhuang and W. Shen: Food Chem. Vol. 109 (2008), p. 264-268
- [7] S.M. O'Sullivan, J.A. Woods and N.M. O'Brien: Br. J. Nutr. Vol. 91 (2004), p. 757-764
- [8] M.R. Lornejad-Schäfer, C. Lambert, D.E. Breithaupt, H.K. Biesalski and J. Frank: Eur. J. Nutr. Vol. 46 (2007), p. 79-86
- [9] S. Kitagawa and M. Kamasaki: Chem. Pharm. Bull. Vol. 54 (2006), p. 242-244
- [10] X. Zhang, F. Yang, C. Xu, W. Liu, S. Wen and Y. Xu: Toxicol. In Vitro Vol. 22 (2008), p. 1520-1527
- [11] L. O'Sullivan, L. Ryan and N. O'Brien: Br. J. Nutr. Vol. 98 (2004), p. 38-44
- [12] I. Higuera-Ciapara, L. Felix-Valenzuela, F.M. Goycoolea and W. Arguelles-Monal: Carbohydr. Polym. Vol. 56 (2004), p. 41-45
- [13] A.C. Williams and B.W. Barry: Adv. Drug Deliv. Rev. Vol. 56 (2004), p. 603-618
- [14] K. Kriwet and C.C. Müller-Goymann: Int. J. Pharm. Vol. 125 (1995), p. 231-242
- [15] N. Düzgüneş and S. Nir: Adv. Drug Deliv. Rev. Vol. 40 (1999), p. 3-18

Functionalized and Sensing Materials

doi:10.4028/www.scientific.net/AMR.93-94

Carrier Design for Astaxanthin Delivery

doi:10.4028/www.scientific.net/AMR.93-94.202

References

- [1] M. Guerin, M.E. Huntley and M. Olaizola: Trends Biotechnol. Vol. 21 (2003), p. 210–217
doi:10.1016/S0167-7799(03)00078-7
PMid:12727382
- [2] W. Miki: Pure Appl. Chem. Vol. 63 (1991), p. 141–146
doi:10.1351/pac199163010141
- [3] R.T. Lorenz and G.R. Cysewski: Trends Biotechnol. Vol. 18 (2000), p. 160-167
doi:10.1016/S0167-7799(00)01433-5
PMid:10740262
- [4] S.F. Lockwood, S. O'Malley and G.L. Mosher: J. Pharm. Sci. Vol. 92 (2003), p. 922-926
doi:10.1002/jps.10359
PMid:12661077
- [5] I. Pfitzner, P.I. Francz and H.K. Biesalski: Biochim. Biophys. Acta Vol. 1474 (2000), p. 163-168
- [6] C. Yuan, Z. Jin, X. Xu, H. Zhuang and W. Shen: Food Chem. Vol. 109 (2008), p. 264-268
doi:10.1016/j.foodchem.2007.07.051
- [7] S.M. O'Sullivan, J.A. Woods and N.M. O'Brien: Br. J. Nutr. Vol. 91 (2004), p. 757-764
doi:10.1079/BJN20041094
PMid:15137928
- [8] M.R. Lornejad-Schäfer, C. Lambert, D.E. Breithaupt, H.K. Biesalski and J. Frank: Eur. J. Nutr. Vol. 46 (2007), p. 79-86
doi:10.1007/s00394-006-0635-6
PMid:17225922
- [9] S. Kitagawa and M. Kamasaki: Chem. Pharm. Bull. Vol. 54 (2006), p. 242-244
doi:10.1248/cpb.54.242
- [10] X. Zhang, F. Yang, C. Xu, W. Liu, S. Wen and Y. Xu: Toxicol. In Vitro Vol. 22 (2008), p. 1520-1527
doi:10.1016/j.tiv.2008.05.006
PMid:18644697

- [11] L. O'Sullivan, L. Ryan and N. O'Brien: Br. J. Nutr. Vol. 98 (2004), p. 38-44
doi:10.1017/S000711450769446X
PMid:17445346
- [12] I. Higuera-Ciapara, L. Felix-Valenzuela, F.M. Goycoolea and W. Arguelles-Monal:
Carbohydr. Polym. Vol. 56 (2004), p. 41-45
doi:10.1016/j.carbpol.2003.11.012
- [13] A.C. Williams and B.W. Barry: Adv. Drug Deliv. Rev. Vol. 56 (2004), p. 603-618
doi:10.1016/j.addr.2003.10.025
PMid:15019749
- [14] K. Kriwet and C.C. Müller-Goymann: Int. J. Pharm. Vol. 125 (1995), p. 231-242
doi:10.1016/0378-5173(95)00130-B
- [15] N. Düzgüne and S. Nir: Adv. Drug Deliv. Rev. Vol. 40 (1999), p. 3-18
doi:10.1016/S0169-409X(99)00037-X
PMid:10837777



Effect of carbon, nitrogen and oxygen on carotenoid production by *Phaffia rhodozyma*

Kalyanee Jirasripongpun^{1*}, Panpilard Ringrod¹, Tirawat Piboonsak¹, Wanida Wattanakaroon¹
and Nuananong Jirakanjanakit²

¹Department of Biotechnology, Faculty of Engineering and Industrial Technology, Silpakorn
University, Nakhonpathom 73000, Thailand

²Center for Vaccine Development, Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University, Salaya,
Puttamonthon, Nakhonpathom 73170, Thailand

Abstract

Phaffia rhodozyma, the carotenoid producing yeast with highest content of astaxanthin than other carotenoids, is a promising biological source of astaxanthin production. Since, yields of astaxanthin depend on culture conditions, thus optimization of carotenoid production of *Phaffia rhodozyma* GETH2 strain was performed in this study on the aspect of carbon, nitrogen and oxygen. Among the carbon sources of glucose, fructose, sorbitol and starch, sorbitol was the most suitable carbon source for growth of yeast, whereas glucose was the best carbon source for carotenoid production. In addition, urea was the best nitrogen in enhancing cell mass among various organic and inorganic nitrogen sources studied, while (NH₄)₂SO₄ improved highest carotenoid yield. Carbon and nitrogen concentration was also further verified for carotenoid production by varying glucose and (NH₄)₂SO₄ concentration in the presence and absence of hexadecane, the oxygen vector. Result revealed that high C:N ratio condition provided more growth of yeast, whereas low C:N ratio supported high carotenoid yield. Moreover, hexadecane addition helped promote only growth of yeast but suppressed carotenoid production.

Keywords: Astaxanthin, *Phaffia rhodozyma*, C:N ratio, oxygen vector

*Corresponding author, Tel. –
E-mail : -

Introduction

The yeast *Phaffia rhodozyma* and *Xanthophyllomyces dendrorhous* producing number of carotenoids predominantly astaxanthin are regarded as excellent potential sources for the biotechnological production of dietary astaxanthin (Cruz and Parajó 1998). Astaxanthin is an orange-pink carotenoid pigment that gives a characteristic coloration to some birds, crustaceans and salmon, and has subsequently been used as feed (Storebakken *et al.*, 1987). Moreover, the stronger antioxidant property of astaxanthin than other carotenoids and vitamin E led it popularly used as a functional food and pharmaceutical supplement (Hussein *et al.*, 2006). These extensive applications enhance the demand of astaxanthin production. Many strategies have been reported to increase carotenoid yield from these yeasts, counting the cultivation of a carotenoid-hyperproducing mutant (An *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2004) and the optimization conditions for carotenoid production including pH, oxygen, carbon and nitrogen.



Phaffia rhodozyma is an aerobic organism and thus oxygen supply in liquid cultures is crucial for carotenoid production (Liu *et al.*, 2006). Addition of n-hexadecane as oxygen vector has been documented to enhance carotenoid yield (Liu and Wu, 2006). While, Palágyi *et al.* (2001) and Sun *et al.* (2004) reported the capability of *P. rhodozyma* in utilizing a variety of carbon sources for growth and carotenoid production. Different nitrogen source either organic or inorganic nitrogen was also demonstrated to affect growth and carotenoid production of *P. rhodozyma* (Sun *et al.*, 2004; Ni *et al.*, 2007). However, the suitable carbon and nitrogen source could vary among different strains of *P. rhodozyma*. Some may enhance or decrease yield. Therefore, this study was aimed to search for suitable carbon and nitrogen source for cultivation of GETH2 mutant strain of *P. rhodozyma*. Concentrations of the carbon source and nitrogen source with different carbon and nitrogen ratio was also studied under the presence and absence of n-hexadecane, in order to optimize the C:N ratio for growth and carotenoid production.

Materials and Methods

Micro-organisms and culture conditions

The GETH2 yeast strain was the dark red colony of mutant obtained from EMS mutagenesis of *Phaffia rhodozyma* GM807 using β -ionone selective medium. It was grown in 250 ml Erlenmeyer flasks containing 20 ml of yeast malt (YM) broth, adjusted to a pH of 4.5 and incubated in 175 rpm orbital incubator shaker at 22°C for 6 days. The YM medium was composed of 10.0 g/L glucose, 5.0 g/L bacto-peptone, 3.0 g/L malt extract and 3.0 g/L yeast extract.

The suitable carbon and nitrogen source for the cultivation of *P. rhodozyma* GETH2

The minimal medium contained 10 g/L glucose, 1 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g/L KH_2PO_4 , 0.5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.5 mg/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.14 mg/L ZnCl_2 , 0.27 mg/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, and 1.25 mg/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. To verify for suitable carbon source, fructose, sorbitol or starch was replaced the glucose in culture medium. Alternatively, different nitrogen sources of organic and inorganic i.e., beef extract, urea, casamino acid and ammonium persulphate) at 1% was replaced the $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in the minimal medium.

Effect of carbon, nitrogen and oxygen on growth and carotenoid production

The carbon source (10-20 g/L) and nitrogen source (0.5-1.0 g/L) at different C:N ratio in 20 ml minimal medium, with and without 2% (v/v) n-hexadecane as oxygen vector, were seeded with yeast strain GETH2 and cultivated as above condition.

Measurement of yeast biomass and carotenoid content

All the samplings were carried out in pentad and dry weight (dw) of yeast biomass was obtained by centrifugation to separate cell mass from liquid medium, rinsed twice with double distilled water and then dried at 90°C to constant weight. Carotenoid content was extracted as described previously (Jirasripongpun *et al.*,



2008). Briefly, the yeast cell was disrupted with dimethyl sulphoxide (DMSO) and glass beads, then the solutions of acetone, saturated NaCl and petroleum ether at 1:1:1 (v / v / v) was added to extract the carotenoid. The upper layer of petroleum ether containing carotenoid was collected, measured at 474 nm and calculated for total carotenoid by the following formula:

$$\text{Total carotenoid content } (\mu\text{g carotenoids /g of yeasts}) = \frac{(\text{ml of petrol}) \times (A_{474}) \times 100}{\text{Yeast dry weight} \times 21}$$

Results and Discussion

Effect of carbon and nitrogen source on growth and carotenoid yield

Phaffia rhodozyma, GETH2 strain could utilize different carbon sources of glucose, fructose and sorbitol for growth better than starch. However, sorbitol was the most suitable carbon source for growth as shown in Figure 1. Palágyi *et al.* (2001) reported that *Phaffia rhodozyma* grow well on various monosaccharide except lactose. However, the absence of amylase enzyme in yeast, found in the present study, led to no degradation of starch and subsequently caused remarkably low growth of the yeast. It could be observed that carotenoid production was not increased with cell mass. Sorbitol though provided highest cell mass but gave less carotenoid yield. Glucose was revealed to be the best carbon source for carotenoid production by the mutant strain among all tested carbon sources. This was similar to what reported by Sun *et al.* (2004) that mutant 3A4-8 grew well in sorbitol and glucose was a better carbon source for carotenoid yield.

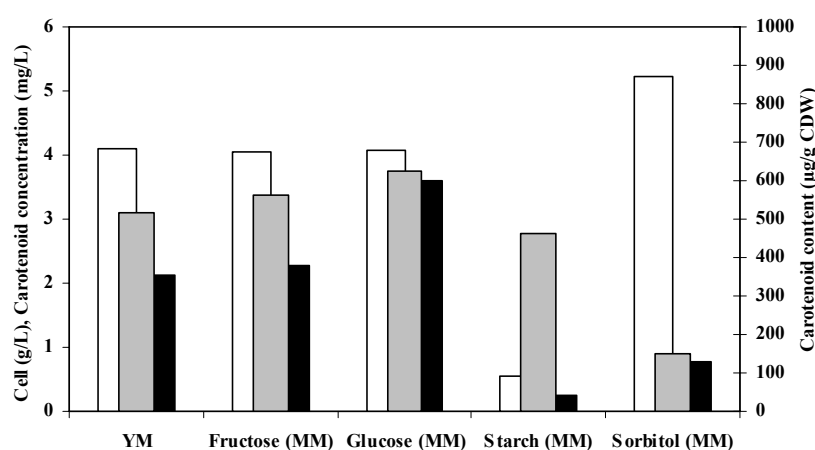


Figure 1. Effect of various carbon sources in minimal medium on growth (white) carotenoid content (grey) and carotenoid yield (black) of *P. rhodozyma* GETH2 as compared to YM medium containing glucose as carbon source.



Studying for the suitable nitrogen source, beef extract, urea, casamino acid, ammonium persulphate and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ demonstrated that each nitrogen source had different potency on growth and carotenoid production (Figure 2). The GETH2 strain was able to grow better in urea than casamino acid and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, while beef extract gave the poorest growth. The increasing of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ to 1% gave more cell mass as compared to the previous study at 0.1%. This emphasized that nitrogen is essential for protein synthesis and resulted in higher cell mass. However, the result was in contrast to the previous report that beef extract was the best nitrogen source for growth and carotenoid production than ammonium sulphate and urea, respectively (Sun *et al.*, 2004). This may be due to the characteristic of GETH2 strain. Considering on carotenoid production, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ was the best nitrogen source for improving carotenoid yield. This was similar to the study by Ni *et al.* (2007) that $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KNO_3 , NH_4Cl and peptone were better nitrogen sources than beef extract and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ was the best nitrogen for carotenoid production.

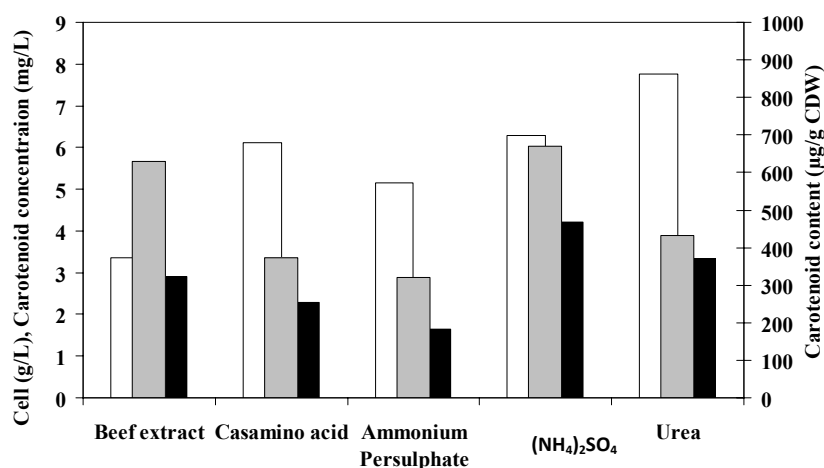


Figure 2. Effect of various nitrogen sources in minimal medium on growth (white) carotenoid content (grey) and carotenoid yield (black) of *P. rhodozyma* GETH2.

Effect of carbon, nitrogen and oxygen on growth and carotenoid production

Varying carbon and nitrogen concentration in minimal medium provided C:N ratio from 7-29:1. The GETH2 could grow in all these C:N ratio medium under the presence or absence of n-hexadecane but gave lower cell mass than in YM medium (Figure 3). The yeast grew in minimal medium to more cell mass at higher C:N ratio than the lower one. However, for C:N ratio at 29:1, the excess glucose with limited oxygen may led to increase ethanol toxic from the yeast fermentation which subsequently inhibited growth to lower than the C:N ratio at 13:1. Therefore, the optimal C:N ratio for growth of *Phaffia rhodozyma* GETH2 strain in this study was 13:1; the lower or higher C:N ratio than this led to decrease growth. Addition of 2 % n-hexadecane as oxygen vector could also enhance cell growth and its addition at high C:N ratio of 29:1 significantly increase more cell mass. Under the study condition,



carotenoid content was observed to be also highest at C:N ratio of 13:1 but the C:N ratio of 29:1 led to noticeably decrease carotenoid content. Furthermore, addition of n-hexadecane at any studied C:N ratio showed no increasing in carotenoid content. The n-hexadecane could possibly cause the unsuitable condition for carotenoid production due to ice crystal formation in the culture unlike that from the study by Liu and Wu (2006). As a result, addition of hexadecane helped promote only growth of yeast but suppressed carotenoid production. Therefore, carbon and nitrogen played more roles on carotenoid production than the oxygen for GETH2 strain under the studied condition

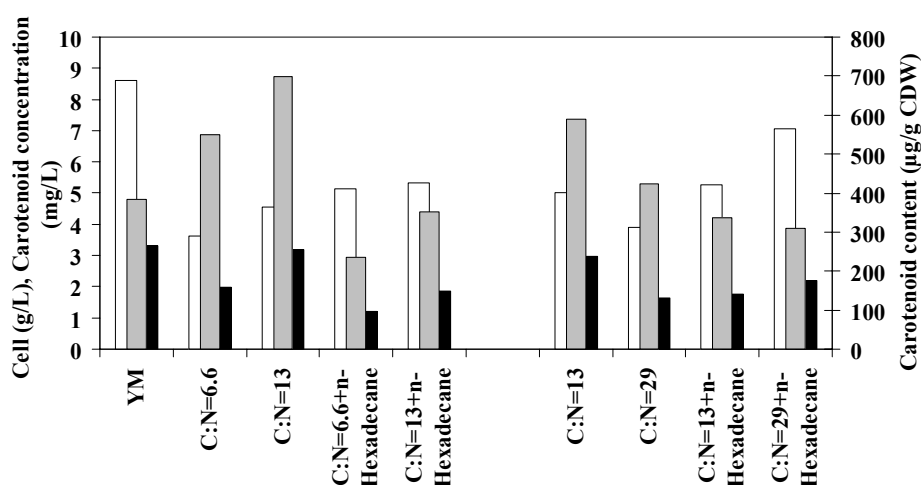


Figure 3. Effect of C:N ratio in minimal medium on growth (white), carotenoid content (grey) and carotenoid yield (black) of *P. rhodozyma* GETH2 strain in medium based on glucose 10 g/L (left panel) and 20 g/L (right panel) under the presence or absence of n-hexadecane, in comparison with YM.

Conclusion

Phaffia rhodozyma, GETH2 strain utilized various carbon and nitrogen source for growth and carotenoid production. The suitable carbon and nitrogen source including the C:N ratio were key factors for growth and carotenoid production rather than n-hexadecane.

Acknowledgements

Many thank to Thailand research fund (DBG5180019) and the Department of Biotechnology, Faculty of Engineering and Industrial Technology, Silpakorn University, Thailand in supporting this research project.



References

- An G., Jang B., Cho, M. 2001. Cultivation of carotenoid-hyperproducing mutant 2A2n of the red-yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) with molasses. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 92:121-125.
- Cruz, J.M., Parajo, J.C. 1998. Improved astaxanthin production by *Xanthophyllomyces dendrorhous* growing on enzymatic wood hydrolysates containing glucose and cellobiose. *Food Chemistry* 63:479-478.
- Hussein, G., Sankawa, U., Goto, H., Matsumoto, K., Watanabe, H. 2006. Astaxanthin, a Carotenoid with Potential in Human Health and Nutrition. *Journal of Natural Products* 69: 443-449.
- Jirasripongpun, K., Pewlong, W., Kitraksa, P., Krudngern, C. 2008. Carotenoid production by *Xanthophyllomyces dendrorhous*: use of pineapple juice as a production medium. *Letters in Applied Microbiology* 47: 112–116.
- Liu, Y.S., Wu, J.Y. 2006. Use of n-hexadecane as an oxygen vector to improve *Phaffia rhodozyma* growth and carotenoid production in shake-flask cultures. *Journal of Applied Microbiology* 101: 1033-1038.
- Liu, Y.S., Wu, J.Y., Ho, K.P. 2006. Characterization of oxygen transfer conditions and their effects on *Phaffia rhodozyma* growth and carotenoid production in shake flask cultures. *Biochemical Engineering Journal* 27: 331–335.
- Ni, H., Chen, Q., Ruan, H., Yang, Y., Li, L., Wu, G., Hu, Y., He, G. 2007. Studies on optimization of nitrogen sources for astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma*. *Journal of Zhejiang University Science B* 8: 365-370.
- Palágyi Zs., Ferenczy L., Vágvölgyi Cs. 2001. Carbon-source assimilation pattern of the astaxanthin-producing yeast *Phaffia rhodozyma*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 17: 95-97.
- Storebakken T., Foss P., Schiedt K., Austreng E., Liaaen-Jensen S., Manz U. 1987. Carotenoids in diets for salmonids. IV. Pigmentation of Atlantic salmon with astaxanthin, astaxanthin dipalmitate and canthaxanthin. *Aquaculture* 65: 279-282.
- Sun, N., Lee, S., Song, K.B. 2004. Characterization of a carotenoid-hyperproducing yeast mutant isolated by low-dose gamma irradiation. *International Journal Food and Microbiology* 94: 263-267.



Modified DPPH assay for antioxidant capacity determination of astaxanthin

Kalyanee Jirasripongpun^{1*}, Tanapon Angkutranon¹, Wanida Wattanakaroon¹ and Nuananong Jirakanjanakit²

¹*Department of Biotechnology, Faculty of Engineering and Industrial Technology, Silpakorn University, Nakhonpathom 73000, Thailand*

²*Center for Vaccine Development, Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University, Salaya, Puttamonthon, Nakhonpathom 73170, Thailand*

Abstract

Astaxanthin, a powerful antioxidant of lipophilic carotenoid in xanthophylls group was aimed to determine for its radical scavenging capacity using DPPH assay. Its poor solubility in aqueous phase of DPPH radical solution has limited the assay capacity. Therefore, different types of solvent including methanol, DMSO, petroleum ether, dichloromethane, ethyl acetate, tetrahydrofuran and hexane was evaluated based on criteria; non-reducing capacity of the solvent, completely solubility in aqueous phase of DPPH radical solution and the compatibility of the solvent in microplate reader system. Reaction kinetics of various solvents in DPPH assay revealed DMSO to be the most suitable solvent based on these criteria. Evaluation of the scavenging capacity using DMSO as solvent for DPPH demonstrated that the effective concentration (EC₅₀) of astaxanthin was almost 4.5 times (41.99 μ M) lower than that of α -tocopherol (191.36 μ M). In other word, astaxanthin has much higher scavenging activity than α -tocopherol. This modified DPPH assay was appropriate to be used for determining the scavenging activity of carotenoid extract from natural product i.e., *Phaffia rhodozyma* yeast. The assay was simple with potential of large scale screening for antioxidant activity using microplate system.

Keywords: Astaxanthin, antioxidant activity, DPPH assay

*Corresponding author

E-mail: -

Introduction

Astaxanthin, the red lipid soluble carotenoid belonging to the xanthophylls group, has a strong natural antioxidant property that does not contain vitamin A activity. It was demonstrated to reduce risk of diseases such as age-related macular degeneration, ischemic diseases (Tso and Lam, 1996) and various degenerative disorders of cancer including cardiovascular diseases (Mayne, 1996). Thus, strong antioxidant activity of astaxanthin has been suggested to be used in preventive medicine. *Phaffia rhodozyma*, the carotenoid producing yeast, provides the highest content of astaxanthin than other carotenoid as determined by spectrophotometer (Jirasripongpun *et al.*, 2008) and HPLC. Its antioxidant activity was mostly determined by tedious in vivo assay such as lipid peroxidation (Miki, 1991). The simplified cell-free system using DPPH assay in micro multi-well plate would be



more effective in determination of carotenoid antioxidant activity. It could be used as inexpensive routine assay for screening quality of carotenoid.

The in vitro antioxidant capacity assays mostly based on either inhibition of free radical by induction the oxidation reaction or quenching of stable free radicals (Huang *et al.*, 2005). DPPH scavenging assay has been used worldwide in the quantification of free radical scavenging activity. The reaction is based on the color decrease occurring when the electron of the nitrogen atom in DPPH radical is reduced by hydrogen atom from antioxidant compounds. However, few studies on DPPH assay of astaxanthin have been reported (Rao *et al.*, 2006; Kamath *et al.*, 2008). This was probably due to the poor aqueous solubility of astaxanthin which limited its use in aqueous-phase radical scavengers of DPPH. However, Liu and Osawa (2007) have modified the technique by the use of HPLC for determination the antioxidant capacity of astaxanthin. In this study, the DPPH assay was improved using microplate system which can be simply measured by microplate reader. Initially, various solvents which have been reported to dissolve or extract carotenoids from yeast were analyzed for being used as a suitable solvent or vehicle to introduce carotenoids into the aqueous test systems of DPPH. After the solvent which provided stable DPPH radical and homogeneous reaction solution was chosen, the system was evaluated for antioxidant activity of carotenoid extracting from *Phaffia rhodozyma*. The lipophilic chemicals of synthetic astaxanthin and α -tocopherol were also analyzed for comparison.

Materials and Methods

Screening for suitable solvent used in DPPH assay

Methanol, DMSO, petroleum ether, dichloromethane, ethyl acetate, TFH and hexane were screened for a suitable solvent in aqueous-phase of DPPH radical solution to be used for lipophilic sample. The DPPH radical solution was freshly prepared in methanol and kept away from light during the assay. For the test, 20 μ l of each solvent was added to 180 μ l DPPH radical solutions to a final concentration of 70 μ M in 96 well-plates, in triplicate. The absorbance was read at 517 nm at every 10 min interval for 1 h by microplate reader. The remaining DPPH was computed from standard curve of DPPH radical solution. Then, the percentage of DPPH was plotted against time to obtain reaction kinetics of each solvent.

Evaluation of antioxidant capacity using modified DPPH assay

To evaluate scavenging effect of the samples, 20 μ l of synthetic astaxanthin, carotenoid extract from yeast or α -tocopherol in DMSO, at various concentrations, was mixed with 180 μ l of DPPH radical solution in DMSO. After 30 min reaction, the absorbance was read and % scavenging effect was calculated using the following equation:

Scavenging effect (%) = (OD of the control-OD of the sample)/(OD of the control) $\times$ 100

DPPH concentration was determined from standard curve of DPPH radical solution prepared in DMSO. Then % DPPH remaining was plotted against sample concentration to determine for EC₅₀, the antioxidant concentration that decrease the initial DPPH radical concentration by 50%. Antiradical efficiency (AE) defined as 1/EC₅₀ was computed to determine scavenging capacity of samples.



Results and Discussion

Screening for suitable solvent used in DPPH assay

Study on radical scavenging effect of solvents in DPPH assay using plate reader revealed that DMSO was the most suitable solvent for determination of carotenoid antioxidant activity. For homogeneity testing, most solvents were mixed well in test reaction of DPPH solution, except for petroleum ether and hexane. The two phases in the test reaction by these solvent could lead to incapability of carotenoid introduction into the DPPH radical solution. Therefore, petroleum ether and hexane were not appropriate for the assay system. Considering the kinetic reaction of tested solvents revealed that THF reduced DPPH radical faster than dichloromethane, petroleum ether, methanol, hexane, ethyl acetate and DMSO, respectively, within 1 h of reaction period (Table 1). Furthermore, the solvent with R^2 value closed to 1 implied its stronger reducing agent than that of the solvent close to 0. Therefore, DMSO and ethyl acetate were suitable solvent for the test. However, ethyl acetate eroded the plastic of 96 well-plates, so it was not well suited to be used in microplate reader.

The pure DMSO caused no effect on radical scavenging in the present study and it was then applied for DPPH assay system as pure solvent in the reaction to provide a homogeneous reaction solution. The DPPH radical solution in DMSO was further used to evaluate antioxidant capacity of carotenoid samples and α -tocopherol.

Table 1. Effect of various solvents depicted as kinetic reaction in DPPH radical reaction within 1 h of reaction period.

Solvents	kinetic reaction	R^2
Methanol	$y = -0.7296x + 100.7$	0.9716
DMSO	$y = 0.0929x + 99.721$	0.5684
Dichloromethane	$y = -2.6912x + 102.42$	0.9923
Petroleum Ether	$y = -0.7313x + 100.98$	0.9747
THF	$y = -4.1813x + 101.71$	0.9267
Hexane	$y = -0.732x + 100.2$	0.9426
Ethyl acetate	$y = -0.3722x + 101.36$	0.6607

Evaluation of antioxidant capacity using modified DPPH assay

Reaction of α -tocopherol in DPPH solution caused sharply decrease in OD reading of DPPH radical while astaxanthin-DPPH mixture was brown due to the red color of astaxanthin. After subtraction absorbance of astaxanthin, its high potency antioxidant could be demonstrated. Table 2 showed that astaxanthin was a more powerful antioxidant than α -tocopherol. Its antiradical efficiency was 4.5 fold higher than α -tocopherol. While one molecule of α -tocopherol scavenges two molecules of DPPH radicals, astaxanthin scavenged more DPPH radicals due to its free electron donation from oxygen group, hydroxyl group, methyl group and conjugated double bond in astaxanthin molecule. However, carotenoid extract from yeast showed very



low radical scavenging effect. This was due to the contamination of extracting solvent which affect to concentration of astaxanthin in the extract as demonstrated from the light orange color of carotenoid solution. Additinally, the natural carotenoid extract from yeast contained approximately 74% of astaxanthin and thus resulted in lower scavenging activity. Nervertheless, the simlified DPPH assay using the same solvent for astaxanthin would provide a promising tool for evaluation of antioxidant capacity of natural product.

Table 2. Scavenging effect of astaxanthin, β -carotene, α -tocopherol based on EC50 and antiradical efficiency.

Samples	EC50	AE
Astaxanthin (syn)	41.987	0.0238
α -tocopherol	191.36	0.0052
Carotenoid extract	248.57	0.004

Conclusion

The limitation on DPPH assay for determination the antioxidant capacity of astaxanthin could be overcome by the use of DMSO as a solvent for DPPH radical solution and the tested samples. DMSO used in DPPH assay also made it possible to evaluate antioxidant activity of both hydrophilic and lipophilic samples. Furthermore, the method based on microplate reader made also the feasibility for testing the scavenging effect of substances in large scale.

Acknowledgements

Gratefully thank was to the Department of Biotechnology, Faculty of Engineering and Industrial Technology, Silpakorn University. This study was supported by the Thailand research fund (DBG5180019).

References

- Huang, D., Ou, B., Prior, R.L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 53: 1841-1856.
- Jirasripongpon, K., Pewlong, W., Kitraksa, P., Krudngern, C. 2008. Carotenoid production by *Xanthophyllomyces dendrorhous*: use of pineapple juice as a production medium, *Letters in Applied Microbiology* 47: 112–116.
- Kamath, B.S., Srikanta, B.M. Dharmesh, S.M., Sarada, R. and Ravishankar, G.A. 2008. Ulcer preventive and antioxidative properties of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *European Journal of Pharmacology* 590: 387–395.
- Liu, X., Osawa, T. 2007. *Cis* astaxanthin and especially 9-*cis* astaxanthin exhibits a higher antioxidant activity *in vitro* compared to the all-*trans* isomer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 357: 187–193.



- Liu, D., Shi, J., Ibarra, A.C., Kakuda, Y., Xue, S.J. 2008. The scavenging capacity and synergistic effects of lycopene, vitamin E, vitamin C, and b-carotene mixtures on the DPPH free radical. *LWT-Food Science Technology*. 41: 1344–1349.
- Miki, W. 1991. Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure and Applied Chemistry* 63: 141-146.
- Mayne, S.T., 1996. Beta-carotene, carotenoids, and disease prevention in humans. *FASEB Journal* 10: 690–701.
- Naguib, Y.M.A. 2000. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 48: 1150-1154.