

การพัฒนาวิธีการวัดปริมาณวิตามินบีหกในอาหารแข็งโดยใช้วิธีทางจุลชีววิทยา

Method Development for Vitamin B6 Determination by Microbiological Assay in Solid Media

รัชชัย เพชรด่านเหนือ (Ruckchai Patchdannaue)* ยานี ทรองพานิชย์ (Yanee Trongpanich)**

บทคัดย่อ

Agar diffusion assay (ADA) เป็นวิธีหนึ่ง que พัฒนาเพื่อใช้ในการวัดปริมาณวิตามินบีหกในอาหาร และผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ วิธี ADA อาศัยหลักการตอบสนองต่อวิตามินบีหกของเชื้อยีสต์ *S. carlsbergensis* ATCC9080 ในอาหารแข็ง จากการศึกษาคพบว่าความเข้มข้นของวุ้นที่ใช้ในอาหาร ปริมาณอาหาร อัตราส่วนยีสต์ต่อปริมาณอาหาร เวลาในการบ่มก่อนและหลังทดสอบ เป็นปัจจัยที่มีผลต่อการวัดปริมาณวิตามินบีหกด้วยวิธี ADA ผลการทดลองพบว่าสภาวะที่เหมาะสมของวิธี ADA ได้แก่ ความเข้มข้นวุ้น 1.5% ปริมาณอาหารแข็ง 10 มิลลิลิตร อัตราส่วนยีสต์ต่ออาหารแข็ง 0.5 ต่อ 100 มิลลิลิตร เวลาบ่มก่อนการทดสอบ 6 ชั่วโมง และเวลาบ่มหลังการทดสอบ 6 ถึง 48 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบสภาวะเริ่มต้นกับสภาวะที่เหมาะสมพบว่า สภาวะที่เหมาะสมมีความแม่นยำและความไวสูงกว่า วิธี ADA จึงเป็นอีกทางเลือกที่ใช้ในการวัดปริมาณวิตามินบีหกในผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่ายและต้นทุนต่ำ

ABSTRACT

An agar diffusion assay (ADA) has been developed for quantifying vitamin B6 in natural products. The principle of this method is based on microbiological assay in solid media using *S. carlsbergensis* ATCC 9080. Based on the factors affecting the commonly use microbial agar diffusion technique, agar concentration, agar volume, the ratio of yeast to medium, pre – incubation time and post – incubation time were selected for the optimization of ADA condition. The results showed the optimum condition for the assay as follows. Assay medium: pyridoxine Y medium, 1.5% agar and 10 ml agar volume. The ratio of 1.0 OD660 yeast to medium was 0.5 to 100 ml medium. Pre - incubation: 30°C, 6 h. Post – incubation: 30°C, 6 to 48 h. Comparison between the initial and optimized conditions has been done. The optimized condition showed high accuracy and sensitivity. This proposed ADA can be used in the determination of vitamin B6 in natural products because of its simplicity and cost – effectiveness.

คำสำคัญ: การตรวจวัด วิธีทางจุลชีววิทยา วิตามินบีหก

Key Words: Determination, Microbiological assay, Vitamin B6

* นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

** รองศาสตราจารย์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทนำ

วิตามินบีหกเป็นวิตามินที่ละลายน้ำ มีคุณสมบัติทนความร้อนได้ดีในสภาพเป็นกรด สลายตัวได้ง่ายเมื่ออยู่ภายใต้แสง ประกอบด้วย 6 รูป ได้แก่ รูปอิสระ 3 รูปคือ Pyridoxine (PN), Pyridoxal (PL), Pyridoxamine (PM) และในรูปอนุพันธ์ฟอสเฟตเอสเทอร์อีก 3 รูปคือ Pyridoxine 5'-phosphate (PNP), Pyridoxal 5'-phosphate (PLP) และ Pyridoxamine 5'-phosphate (PMP) นอกจากนี้ยังพบในรูปอนุพันธ์ของคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ Pyridoxine- β -glucoside ซึ่งพบได้ในพืชหลายชนิด (Do et al., 2012)

วิตามินบีหกเป็นสารประกอบอีกอย่างหนึ่งที่มีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิต เนื่องจากวิตามินบีหกทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ในปฏิกิริยาชีวเคมีมากกว่า 100 ปฏิกิริยา (Leuendorf et al., 2010) วิตามินบีหกที่ทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ส่วนใหญ่อยู่ในรูป PLP ซึ่งจำเป็นต่อการเผาผลาญโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมัน ช่วยในการสังเคราะห์สารสื่อประสาทและเม็ดเลือดแดง (Rybak and Pfeiffer., 2009) ทำหน้าที่เป็นตัวให้และรับอิเล็กตรอนในกระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอ ที่เกิดจากอนุมูลอิสระ (Liu et al., 2012) และมีความสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกัน (Stuart et al., 2005) นอกจากนี้วิตามินบีหกยังมีความสำคัญต่อการตอบสนองของพืชต่อสภาวะแล้ง (Denslow et al., 2007) ในปัจจุบัน วิตามินบีหกถูกนำมาใช้ในการป้องกันและลดอาการข้างเคียงต่างๆ ที่เกิดจากโรคเบาหวาน และจากประโยชน์ที่กล่าวมาข้างต้น ทำให้วิตามินบีหกถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม เครื่องสำอาง อาหารเสริม และอาหารสัตว์

Microbiological assay (Guilarte et al., 1980) เป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ในการวัดปริมาณวิตามินบีหก โดยการวัดการเจริญของยีสต์ที่ต้องการวิตามินบีหกในการเจริญที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร วิธีนี้ใช้วัดปริมาณวิตามินบีหกทั้งหมดในสารสกัดจากธรรมชาติ และอาหาร ซึ่งวิตามินบีหกทั้งหมดจะถูกย่อยด้วยกรดใน

อุณหภูมิสูงเพื่อเปลี่ยนจากรูปฟอสเฟต และ เบตาไร-ไกลโกไซด์ให้อยู่ในรูปอิสระก่อน แต่มีข้อเสียคือ ในระหว่างการเจริญของยีสต์อาจเกิดการปนเปื้อนของเชื้ออื่นได้ง่าย นอกจากนั้นการวิเคราะห์วิตามินบีหกในอาหารอาจถูกรบกวนจากตะกอนของตัวอย่าง ซึ่งทำให้การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินไม่ถูกต้อง

Thin-layer cup-plate (Itagaki et al., 1972) เป็นวิธีการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบีหกที่พัฒนามาจากวิธี microbiological assay โดยตัวอย่างที่ทดสอบจะถูกเติมลงใน oxford cup ที่วางอยู่บนอาหารแข็งที่มียีสต์และอาศัยหลักการแพร่ของวิตามินบีหกบนอาหารแข็งเพื่อไปกระตุ้นการเจริญของเชื้อยีสต์ ปริมาณวิตามินบีหกจะสัมพันธ์กับวงการเจริญของเชื้อยีสต์ เป็นวิธีที่ง่ายและสามารถประยุกต์ใช้ได้กว้างขวาง แต่การทดสอบด้วยวิธีนี้ใช้เวลาในการบ่มนาน ต้องใช้กับตัวอย่างในช่วง pH 5 – 6 มีความไวในการทดสอบ 20 ไมโครกรัม ในตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร และต้องใช้ oxford cup เพื่อใส่ตัวอย่าง

ก่อนหน้านี้ได้มีการเสนอวิธี Agar diffusion assay (ADA) (Anutrakunchai et al., 2010) ซึ่งเป็นการวัดปริมาณวิตามินบีหกจากตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้วิธี Microbiological assay บนอาหารแข็ง โดยใช้การเจาะหลุมบนวุ้นเพื่อหยอดตัวอย่าง ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายและใช้อุปกรณ์น้อย แต่อย่างไรก็ตามวิธี ADA ยังไม่มีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม ความไวต่อปริมาณวิตามินบีหก และความถูกต้อง

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสม ปัจจัยที่มีผลต่อการวัดปริมาณวิตามินบีหก และขีดความสามารถของการวัดปริมาณวิตามินบีหกด้วยวิธี ADA เพื่อนำไปพัฒนาใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์

วิธีการวิจัย

1.1 อุปกรณ์และสารเคมี

Pyridoxine (PN) บริษัท Nacalai Tesque Co. ประเทศญี่ปุ่น, Pyridoxine Y Medium (PAM) บริษัท Difco Co. ประเทศฝรั่งเศส, พงู้น บริษัท นางกวัก ประเทศไทย, Yeast extract บริษัท HIMEDIA Co. ประเทศอินเดีย จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (ขนาด 14.2 x 90 mm) บริษัท GOSSELIN ประเทศสหรัฐอเมริกา สารเคมีมีความบริสุทธิ์ระดับ analytical grade

1.2 การวัดปริมาณวิตามินบีหกด้วยวิธี ADA

เลี้ยงเชื้อยีสต์ *Saccharomyces carlsbergensis* (ATCC 9080) บนอาหารแข็ง Yeast mold media (YM) ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เตรียมจานทดสอบ ADA โดยใช้ loop ขูดเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็ง YM ลงในน้ำกลั่นปลอดเชื้อเข้าให้เข้ากันนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ให้มีค่าประมาณ 1.0 (จำนวนเชื้อประมาณ 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงในอาหาร Pyridoxine Assay Medium (PAM: Pyridoxine Y Medium 1.325%, พงู้น 2% (w/v)) ในอัตราส่วน 1:100 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เทลงในจานเลี้ยงเชื้อ (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร สูง 14.2 มิลลิเมตร) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ทิ้งให้อาหารแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง และนำไปบ่มที่ 30°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นเจาะอาหารแข็ง PAM ให้เป็นหลุมวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร เติมน้ำกลั่นมาตรฐาน PN ความเข้มข้นต่างๆ 10 ไมโครลิตรลงในหลุมที่เจาะ นำไปบ่มที่ 30°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมงสร้างกราฟมาตรฐาน โดยแกน X เป็นปริมาณของวิตามินบีหก และแกน Y เป็น ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงเจริญทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ค่า slope แสดงความถูกต้อง ค่า R^2 แสดงความแม่นยำ และนำเชื้อถั่ว ค่า LOQ (limit of quantitation) แสดงปริมาณต่ำสุดที่สามารถวัดได้ หาได้จาก 3.3 เท่าของ slope หาค่า Y intercept ค่า LOD (limit of detection) แสดงปริมาณต่ำสุดที่สามารถวัดได้

อย่างถูกต้อง หาได้จาก 10 เท่าของ slope หาค่า Y intercept (Dresch et al., 2009)

1.3 หาหาที่เหมาะสมแก่การวัดปริมาณวิตามินบีหกด้วยวิธี ADA

1.3.1 ความเข้มข้นของวุ้นที่ใช้ในการเตรียม

อาหาร PAM (%agar)

เตรียมจานทดสอบ ADA โดยเติมเชื้อยีสต์ (OD_{660} เท่ากับ 1.0) อัตราส่วน 1:100 ในอาหาร PAM ที่มีความเข้มข้นของวุ้น 0.5, 1, 1.5, 2 และ 2.5% ตามลำดับ เทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 20 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่ 30°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ขึ้นตอนต่างๆ นอกจากนี้ ทำเช่นเดียวกับที่อธิบายในหัวข้อ 2.2

1.3.2 ปริมาตรอาหารแข็ง PAM ที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณวิตามินบีหก

เตรียมจานทดสอบ ADA โดยเติมเชื้อยีสต์ (OD_{660} เท่ากับ 1.0) อัตราส่วน 1:100 ในอาหาร PAM เทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 มิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นนำไปบ่มที่ 30°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ขึ้นตอนต่างๆ นอกจากนี้ ทำเช่นเดียวกับที่อธิบายในหัวข้อ 2.2

1.3.3 อัตราส่วนของเชื้อยีสต์ต่อ Pyridoxine Assay Medium (PAM)

เตรียมจานทดสอบ ADA โดยเติมเชื้อยีสต์ (OD_{660} เท่ากับ 1.0) อัตราส่วน 0.125:100, 0.25:100, 0.5:100, 1:100, 2:100 และ 4:100 ตามลำดับ ใน Pyridoxine Assay Medium (PAM) เทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 20 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่ 30°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ขึ้นตอนต่างๆ นอกจากนี้ ทำเช่นเดียวกับที่อธิบายในหัวข้อ 2.2

1.3.4 เวลาที่ใช้ในการบ่มเชื้อก่อนทำการวัด

เตรียมจานทดสอบ ADA โดยเติมเชื้อยีสต์ (OD_{660} เท่ากับ 1.0) อัตราส่วน 1:100 ในอาหาร PAM เทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 20 มิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นนำไปบ่มที่ 30°C เป็นเวลา 0, 3, 6, 9 และ 12

ชั่วโมงตามลำดับ ก่อนนำไปเจาะหลุม ขึ้นตอนต่างๆ นอกจากนี้ ทำเช่นเดียวกับที่อธิบายในหัวข้อ 2.2

1.3.5 เวลาที่ใช้ในการบ่มเชื้อหลังทำการ

ทดสอบ

เตรียมจานทดสอบ ADA ตามขั้นตอนที่อธิบายในหัวข้อ 2.2 ภายหลังจากเติมสารละลายมาตรฐาน PN ความเข้มข้นต่างๆ นำไปบ่มที่ 30°C เป็นเวลา 6, 12, 18, 24 และ 48 ชั่วโมง วัดวงการเจริญของเชื้อที่เกิดขึ้นบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.4 ตรวจสอบเพื่อประเมินสถานะที่เหมาะสมและสถานะเริ่มต้น

เลี้ยงเชื้อยีสต์ *Saccharomyces carlsbergensis* (ATCC 9080) บนอาหารแข็ง YM ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมงเตรียมจานทดสอบ ADA โดยใช้ loop ขูดเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็ง YM ลงในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ เขย่าให้เข้ากันนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ให้มีค่าประมาณ 1.0 จากนั้นเติมเชื้อยีสต์ที่ได้ลงในอาหาร PAM ที่มี 1.5% agar ในอัตราส่วน 0.5:100 เทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทิ้งให้อาหารแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง และนำไปบ่มที่ 30°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นเจาะอาหารแข็ง PAM ให้เป็นหลุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร เติมสารละลายมาตรฐาน PN ความเข้มข้นต่างๆ 10 ไมโครลิตรลงในหลุมที่เจาะนำไปบ่มที่ 30°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง วัดวงการเจริญของเชื้อที่เกิดขึ้นบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และเปรียบเทียบกับสถานะเริ่มต้น (1.5% agar, เชื้อยีสต์อัตราส่วน 0.5:100, อาหารเลี้ยงเชื้อ 10 มิลลิลิตร, บ่ม 30°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง)

1.5 ประเมินผลการทดลองทางสถิติ

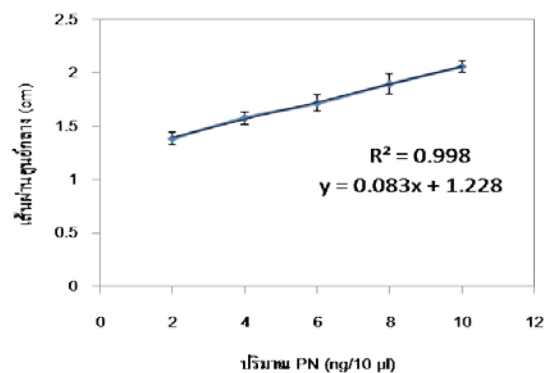
นำขนาดวงการเจริญของเชื้อที่เกิดขึ้นบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่วัดได้ในแต่ละการทดลอง มาสร้างกราฟมาตรฐาน และหาค่า R^2 , slope, y intercept การวิเคราะห์แบบหลายปัจจัย (multiple comparisons) วิเคราะห์โดยใช้ Tukey's test ที่ความเชื่อมั่น 95% ข้อมูลทั้งหมดวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม SPSS

(Statistical Package for the Social Sciences) version 16.0

ผลการวิจัยและอภิปราย

1. การวัดปริมาณวิตามินบีหกด้วยวิธี ADA

การวัดปริมาณวิตามินบีหกโดยวิธี ADA พบว่าหลังจากเติมตัวอย่างและบ่มเป็นเวลา 12 ชั่วโมง เกิดวงการเจริญของยีสต์รอบๆ หลุมที่เติมตัวอย่าง มีลักษณะสีขาว เมื่อทำการวัดขนาดของวงและทำการสร้างกราฟมาตรฐาน พบว่าเส้นกราฟมีลักษณะเป็นเส้นตรง ขนาดของวงเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ PN ตามรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงกราฟมาตรฐานที่ได้จากการการวัดปริมาณวิตามินบีหกด้วยวิธี ADA ที่ความเข้มข้น PN 2-10 ng/10 µl

2. หาสถานะที่เหมาะสมแก่การวัดปริมาณวิตามินบีหกด้วยวิธี ADA

2.1 ความเข้มข้นของวุ้นที่ใช้ในการเตรียม

PAM plate (%agar)

ผลแสดงดังตารางที่ 1 ความเข้มข้นของวุ้นที่มากกว่าจะให้ขนาดวงการเจริญของเชื้อที่เล็กกว่าตามลำดับ ทุกความเข้มข้นมีความความชัดเจนของวงใกล้เคียงกัน และมีความน่าเชื่อถือ ($R^2 > 0.995$) ที่ 1.5% มีความถูกต้องของการวัดมากที่สุด และมีค่า LOD น้อยที่สุดแสดงถึงมีความไวมากที่สุด

2.2 ปริมาตรอาหารแข็ง PAM ที่ใช้ในการ ตรวจวัดปริมาณวิตามินบีหก

ผลแสดงดังตารางที่ 1 เมื่อความเข้มข้นของ
วิตามินบีหกเท่ากัน ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อที่มากกว่าจะ
ให้ขนาดวงการเจริญของเชื้อที่เล็กกว่า ที่ปริมาณอาหาร
แข็ง 30 มิลลิลิตร มีพื้นหลังสีเข้มใกล้เคียงกับสีของ
วงการเจริญของเชื้อ ทำให้สังเกตวงการเจริญได้ยาก ที่
ปริมาณอาหาร 10 มิลลิลิตร มีความถูกต้องของการวัด
มากที่สุด มีความน่าเชื่อถือ ($R^2 > 0.995$) และพื้นหลังจาง
สังเกตวงเจริญของเชื้อได้ชัดเจน

2.3 อัตราส่วนของเชื้อยีสต์ต่อ Pyridoxine Assay Medium (PAM)

ผลแสดงดังตารางที่ 1 ในอาหารแข็ง 100
มิลลิลิตร ที่อัตราส่วนเชื้อมากจะให้ขนาดวงการเจริญ
ของเชื้อที่เล็กกว่า อัตราส่วนเชื้อสูงที่ 4 และ 8 จะมีพื้น
หลังเข้มใกล้เคียงกับสีของวงการเจริญของเชื้อซึ่งสังเกต
วงได้ยาก ที่อัตราส่วน 0.5 มีพื้นหลังจาง สังเกตวงได้
ง่าย มีค่า LOD น้อยที่สุด และมีความถูกต้องของการวัด
มากที่สุด

2.4 เวลาที่ใช้ในการบ่มเชื้อก่อนทำการวัด

เวลาที่ใช้ในการบ่มก่อนการใส่สารตัวอย่าง 0,
3, 6 และ 9 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 1 ที่
เวลา 0 ชั่วโมง ไม่สามารถวัดวงการเจริญได้เนื่องจากวง
มีขนาดใหญ่มากจนทับกันทั่วทั้งจานอาหารเลี้ยงเชื้อ
ส่วนเวลา 3, 6 และ 9 ชั่วโมง ให้ขนาดของวงที่ใกล้เคียง
กัน แต่ที่ 6 ชั่วโมงจะให้วงที่มีความชัดเจน

2.5 เวลาที่ใช้ในการบ่มเชื้อหลังทำการวัด

เวลาที่ใช้ในการบ่มหลังจากใส่ตัวอย่าง 6, 12,
18, 24 และ 48 ชั่วโมง สามารถวัดได้หลัง 6 ชั่วโมง โดย
ผลการทดลองไม่แตกต่างกัน ดังตารางที่ 1

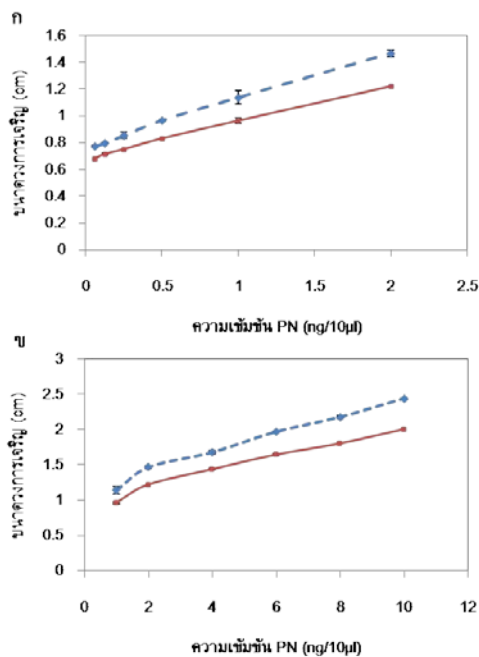
ตารางที่ 1 แสดงข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ขนาด
วงการเจริญของเชื้อโดยโปรแกรม SPSS
ความเข้มข้นของวุ้น (A), ปริมาณอาหารแข็ง
PAM (B), อัตราส่วนยีสต์ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ
(C), เวลาบ่มก่อนทดสอบ (D), เวลาบ่มหลัง
ทดสอบ (E)

factors	factors	slope	sd y intercept	R ²	lnb	lna
A	1.0	0.048 ± 0.005 ^a	0.007 ± 0.005 ^b	0.998 ± 0.002	0.491 ± 0.345 ^a	1.488 ± 1.047 ^a
	1.5	0.064 ± 0.005 ^a	0.014 ± 0.005 ^b	0.997 ± 0.001	0.686 ± 0.091 ^{ab}	2.110 ± 0.276 ^{ab}
	2.0	0.062 ± 0.015 ^{ab}	0.017 ± 0.015 ^a	0.995 ± 0.001	0.891 ± 0.034 ^a	2.700 ± 0.104 ^a
	2.5	0.060 ± 0.003 ^{ab}	0.014 ± 0.003 ^a	0.996 ± 0.001	0.788 ± 0.101 ^{ab}	2.387 ± 0.206 ^{ab}
	3.0	0.073 ± 0.003 ^a	0.018 ± 0.003 ^a	0.996 ± 0.001	0.802 ± 0.078 ^a	2.429 ± 0.237 ^a
B	10	0.060 ± 0.001 ^{ac}	0.013 ± 0.001 ^{ab}	0.996 ± 0.002	0.736 ± 0.203 ^a	2.231 ± 0.616 ^a
	15	0.064 ± 0.005 ^a	0.015 ± 0.005 ^{ab}	0.997 ± 0.001	0.752 ± 0.088 ^a	2.279 ± 0.267 ^a
	20	0.051 ± 0.006 ^a	0.008 ± 0.006 ^a	0.998 ± 0.003	0.483 ± 0.322 ^a	1.464 ± 0.978 ^a
	25	0.057 ± 0.002 ^{cd}	0.010 ± 0.002 ^a	0.998 ± 0.002	0.589 ± 0.212 ^a	1.786 ± 0.644 ^a
	30	0.056 ± 0.004 ^a	0.014 ± 0.004 ^{ab}	0.995 ± 0.001	0.832 ± 0.055 ^{ab}	2.522 ± 0.166 ^{ab}
C	4	0.061 ± 0.001 ^{ac}	0.014 ± 0.001 ^a	0.997 ± 0.001	0.754 ± 0.097 ^{ab}	2.284 ± 0.294 ^{ab}
	2	0.067 ± 0.000 ^{cd}	0.017 ± 0.000 ^{ab}	0.996 ± 0.000	0.821 ± 0.028 ^{ab}	2.488 ± 0.086 ^{ab}
	1	0.078 ± 0.008 ^a	0.013 ± 0.008 ^a	0.998 ± 0.002	0.532 ± 0.274 ^c	1.613 ± 0.831 ^c
	0.5	0.088 ± 0.010 ^a	0.016 ± 0.010 ^{ab}	0.998 ± 0.001	0.606 ± 0.108 ^{bc}	1.835 ± 0.327 ^{bc}
	0.25	0.073 ± 0.001 ^{bc}	0.019 ± 0.001 ^{ab}	0.995 ± 0.000	0.870 ± 0.019 ^a	2.636 ± 0.058 ^a
D	3	0.060 ± 0.001 ^a	0.010 ± 0.001 ^a	0.998 ± 0.001	0.551 ± 0.119 ^a	1.671 ± 0.361 ^a
	6	0.064 ± 0.005 ^{ab}	0.015 ± 0.005 ^a	0.997 ± 0.001	0.752 ± 0.088 ^a	2.279 ± 0.267 ^a
	9	0.068 ± 0.001 ^a	0.017 ± 0.001 ^a	0.996 ± 0.000	0.809 ± 0.039 ^a	2.452 ± 0.117 ^a
	6	0.060 ± 0.001 ^a	0.010 ± 0.001 ^a	0.997 ± 0.002	0.571 ± 0.265 ^a	1.729 ± 0.802 ^a
	12	0.060 ± 0.001 ^a	0.010 ± 0.001 ^a	0.997 ± 0.002	0.571 ± 0.265 ^a	1.729 ± 0.802 ^a
E	18	0.060 ± 0.001 ^a	0.010 ± 0.001 ^a	0.997 ± 0.002	0.571 ± 0.265 ^a	1.729 ± 0.802 ^a
	24	0.060 ± 0.001 ^a	0.010 ± 0.001 ^a	0.997 ± 0.002	0.571 ± 0.265 ^a	1.729 ± 0.802 ^a
	48	0.060 ± 0.001 ^a	0.010 ± 0.001 ^a	0.997 ± 0.002	0.571 ± 0.265 ^a	1.729 ± 0.802 ^a
	48	0.060 ± 0.001 ^a	0.010 ± 0.001 ^a	0.997 ± 0.002	0.571 ± 0.265 ^a	1.729 ± 0.802 ^a
	48	0.060 ± 0.001 ^a	0.010 ± 0.001 ^a	0.997 ± 0.002	0.571 ± 0.265 ^a	1.729 ± 0.802 ^a

ความเข้มข้นของวุ้น 1, 1.5, 2, 2.5% (W/V), ปริมาณ
อาหารเลี้ยงเชื้อ 10, 15, 20, 25, 30 มิลลิลิตร, อัตราส่วน
ยีสต์ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 ต่อ
100 มิลลิลิตร (V/V), เวลาบ่มก่อนทดสอบ 3, 6, 9
ชั่วโมง, เวลาบ่มหลังทดสอบ 6, 12, 18, 24, 48 ชั่วโมง
การวิเคราะห์แบบหลายปัจจัย (multiple comparison)
แสดงในรูปอักษร A, B, C, D เพื่อบอกความต่างของข้อมูล
ในแต่ละปัจจัย

2.6 ตรวจสอบเพื่อประเมินสภาวะที่เหมาะสม และสภาวะเริ่มต้น

เมื่อทำการสร้างกราฟจากข้อมูลขนาดวงการ
เจริญของเชื้อทั้งสภาวะที่เหมาะสมและสภาวะเริ่มต้น
พบว่าค่าความชัน และความไว ของสภาวะที่เหมาะสมมี
ค่ามากกว่าสภาวะเริ่มต้น สภาวะที่เหมาะสมมีพื้นหลังสี
จางกว่าอย่างเห็นได้ชัด แต่มีความเข้มวงเจริญใกล้เคียง
กัน พื้นหลังสีจางกว่าจึงสามารถวัดวงได้ง่าย และมี
โอกาสผิดพลาดน้อยกว่า สภาวะที่เหมาะสมตอบสนอง
ต่อวิตามินบีหกสูงกว่า จากวงการเจริญของเชื้อใหญ่กว่า
ที่ความเข้มข้นวิตามินบีหกเท่ากันในช่วง 0.06 – 2 ng/10
μl และ 1 – 10 ng/10 μl แสดงดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 แสดงกราฟมาตรฐานที่เปรียบเทียบระหว่าง
 สภาวะที่เหมาะสม (.....) และสภาวะเริ่มต้น
 (—) ที่ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐาน PN
 (ก) 0.06 – 2 ng/10 µl และ (ข) 1 – 10 ng/10 µl

สรุปผลการวิจัย

วิตามินบีหกในรูปอิสระสามารถกระตุ้นการ
 เจริญของเชื้อยีสต์ที่ผสมในวุ้นและเกิดวงสีขาว ซึ่งม
 ความสัมพันธ์เชิงเส้นกับปริมาณวิตามินบีหก ด้วย
 คุณสมบัติดังกล่าวจึงทำให้วิธี ADA สามารถวัดปริมาณ
 วิตามินบีหกได้ จากการวิจัยเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสม
 พบ สภาวะที่เหมาะสมที่ได้มีความถูกต้อง และความไว
 ในทางสถิติสูงกว่าสภาวะเริ่มต้น โดยความเข้มข้นของ
 วิตามินบีหกเพียง 0.02 ng/10 µl ก็เพียงพอที่จะกระตุ้น
 ให้เกิดวงการเจริญของเชื้อได้ วิธี ADA สามารถใช้ใ
 การตรวจสอบปริมาณวิตามินบีหกในตัวอย่างอาหาร
 หรือผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ รวมถึงใช้ในงานวิจัยที่ต้อง
 ออกเก็บ และวิเคราะห์ตัวอย่างตัวอย่างนอกสถานที่ ซึ่ง
 เป็นวิธีที่สะดวก ง่าย และต้นทุนต่ำ

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการทุนสนับสนุนจาก
 โครงการทุนอุดหนุนและส่งเสริมการทำวิทยานิพนธ์
 ซึ่งจัดตั้งโดย บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น
 รหัสทุน 55231114

เอกสารอ้างอิง

- Anutrakunchai, C., Niamsanit, S., Wangsomnuk,
 PP., Trongpanich, Y. Isolation and
 characterization of vitamin B6-producing
 thermophilic bacterium, *Geobacillus* sp. H6a.
 JGAM 2010; 56: 273-279
- Denslow, S., Rueschhoff, E., Daub, M. Regulation of
 the *Arabidopsis thaliana* vitamin B6
 biosynthesis genes by abiotic stress. IPPB
 2007; 42: 152 – 161
- Dresch, M., Rossato, SB., Kappel, VD., Biegelmeyer,
 R., Hoff, M., Mayorga, P., Zuanazzi, J.,
 Henriques, AT., Moreira, J. Optimization
 and validation of an alternative method to
 evaluate total reactive antioxidant potential.
 Anal biochem 2009; 385:107-114
- Do, HTV., Ide, Y., Mugo, AN., Yagi, T. All-
 enzymatic HPLC method for determination
 of individual and total contents of vitamin B6
 in foods. Food Nutr. Res. 2012; 56: 1-8
- Guilarte, TR., McIntyre, PA., Tsan, MF. Growth
 response of the yeasts *Saccharomyces*
uvarum and *Kloeckera brevis* to the free
 Biologically active form of vitamin B6. J
 NUTR 1980; 110: 954-958
- Itagaki, T. AND Tsukahara, T. Microbiological Assay
 of Vitamin B6 by Thin-Layer Cup-Plate
 Method with *Saccharomyces carlsbergensis*.
 J Nutr Sci Vitaminol 1972; 18: 90 – 96

- Liu, SQ., Sun, WH., Li, LC., Li, H., Wang, XL.
Electrocatalytic Oxidation and Voltammetric
Determination of Vitamin B6 by a ssDNA-
modified Electrode. *J. Electrochem* 2012; 7:
324-337
- Leuendorf, JE., Osoriob, S., Szewczyk, A., Fernieb,
AR., Hellmann, H. *Mol. Plant.* 2010; 5: 890
- 903
- Rybak, ME., Pfeiffer, CM. A simplified protein
precipitation and filtration procedure for
determining serum vitamin B6 by high-
performance liquid chromatography. *Anal*
Biochem 2009; 388: 175-177
- Studart, MT., Titiz, O., Raschle, T., Forster, G.,
Amrhein, N. and Fitzpatrick, TB. Vitamin
B6 biosynthesis in higher plant. *PNAS* 2005:
13687 – 13692
- Itagaki, T. AND Tsukahara, T. Microbiological Assay
of Vitamin B6 by Thin-Layer Cup-Plate
Method with *Saccharomyces carlsbergensis*.
J Nutr Sci Vitaminol 1972; 18: 90 – 96