การใช้น้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมผลิตปลาส้มในการผลิตแคโรทีนอยด์โดยยีสต์ *Rhodotorula mucilaginosa* UP12

อรวรรณ ยะมนต์

วิทยานิพนธ์เสนอมหาวิทยาลัยพะเยา เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
มีนาคม 2564

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยพะเยา

การใช้น้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมผลิตปลาส้มในการผลิตแคโรทีนอยด์โดยยีสต์ *Rhodotorula mucilaginosa* UP12

อรวรรณ ยะมนต์

วิทยานิพนธ์เสนอมหาวิทยาลัยพะเยา เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
มีนาคม 2564
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยพะเยา

THE UTILIZATION OF WASTEWATER FROM FERMENTED FISH INDUSTRY FOR CAROTENOID PRODUCTION BY *RHODOTORULA MUCILAGINOSA* UP12

ARAWAN YAMONE

A Thesis Submitted to University of Phayao

in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Master of Science Degree in Biotechnology

March 2021

Copyright 2020 by University of Phayao

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การใช้น้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมผลิตปลาส้มในการผลิตแคโรทีนอยด์

โดยยีสต์ *Rhodotorula mucilaginosa* UP12

ของ อรวรรณ ยะมนต์

ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ของมหาวิทยาลัยพะเยา

..... ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(ดร.สุกัญญา จีนเหนาะ)

..... ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุภาพร ภัสสร)

..... อาจารย์บัณฑิตศึกษามหาวิทยาลัยพะเยา

(ดร. รวิสรา รื่นไวย์)

..... คณบดีคณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. บุญฤทธิ์ สินค้างาม)

เรื่อง: การใช้น้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมผลิตปลาส้มในการผลิตแคโรทีนอยด์
โดยยีสต์ *Rhodotorula mucilaginosa* UP12

ผู้วิจัย: อรวรรณ ยะมนต์, วิทยานิพนธ์: วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ), มหาวิทยาลัยพะเยา, 2563

อาจารย์ที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุภาพร ภัสสร

คำสำคัญ แคโรทีนอยด์, น้ำทิ้งจากการผลิตปลาส้ม, Rhodotorula mucilaginosa UP12

บทคัดย่อ

แคโรทีนอยด์ คือ เม็ดสีธรรมชาติที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ สารตั้งต้นของไวตามิน เอ และมีศักยภาพในการป้องกันความเสียหายของเซลล์และเนื้อเยื่อ แคโรทีนอยด์จึงมีบทบาทสำคัญต่อสุขภาพมนุษย์และสัตว์ ซึ่งถูกใช้อย่างแพร่หลายในอุตสหกรรมอาหาร อาหารเสริม และอาหารสัตว์ เพื่อผลิตแคโรทีนอยด์ด้วยอาหารต้นทุนต่ำ จึงทำการศึกษาสูตรอาหารโดยใช้น้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมการผลิตปลาส้มเป็นองค์ประกอบเพื่อใช้ผลิตสารแคโรทีนอยด์จากยีสต์ *Rhodotorula mucilaginosa* UP12 แยกจากดินในเขต มหาวิทยาลัยพะเยา โดยทดลองเลี้ยงยีสต์ในสูตรอาหารปรับส่วนผสมทั้งหมด 6 สูตร เปรียบเทียบกับอาหารควบคุม YM พบว่า อาหารสูตร C5 เหมาะสมสำหรับการผลิตแคโรทีนอยด์ มีองค์ประกอบดังนี้ น้ำล้างปลาเติมน้ำตาลซูโครส 10 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอช 5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ระยะเวลา 7 วัน สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงสุด ใกล้เคียงกับอาหารควบคุม โดยมีปริมาณแคโรทีนอยด์ 152.66±20.29 ไมโครกรัมต่อกรัมยีสต์แห้ง และปริมาณผลผลิตทั้งหมดเท่ากับ 0.93±0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีปริมาณแคโรทีนอยด์สูงกว่า การเลี้ยงในอาหาร C1 (น้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมปลาส้ม) และ YM ในสภาวะเดียวกัน เท่ากับ 2.02 และ 1.22 เท่า ตามลำดับ จากการนำอาหารสูตร C5 ที่เติมและไม่เติมสารสกัดยีสต์ 1 กรัมต่อลิตร ขยายผลการผลิตแคโรทีนอยด์ในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการขนาด 5 ลิตร พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร C5 เป็นเวลา 6 วัน พบปริมาณแคโรทีนอยด์ภายในเซลล์สูงที่สุด เท่ากับ 173.93 ไมโครกรัมต่อกรัมยีสต์แห้ง และปริมาณผลผลิตทั้งหมดเท่ากับ 1.2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีปริมาณสูงกว่าการเลี้ยงในอาหาร C5 แบบเขย่าฟลาสก์ 1.14 เท่า และเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร C5 ที่เติมสารสกัดยีสต์ สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงที่สุด เท่ากับ 194.83 ไมโครกรัมต่อกรัมยีสต์แห้งและปริมาณผลผลิตทั้งหมดเท่ากับ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ช่วงระยะการเพาะเลี้ยงที่สั้นกว่าสภาวะไม่เติมยีสต์ คือ 5 วัน โดยการเติมสารสกัดยีสต์ช่วยเพิ่มการผลิตแคโรทีนอยด์สูงกว่าสภาวะที่ไม่เติม ประมาณ 1.25 เท่า ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์ด้วยอาหาร C5 ที่เติมสารสกัดยีสต์ในถังหมัก ทำการควบคุมพีเอช เท่ากับ 5 เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการปั่นกวน 150 รอบต่อนาที มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการผลิตแคโรทีนอยด์ รวมถึงต้นทุนค่าอาหาร C5 ที่เติมสารสกัดยีสต์ มีต้นทุน เท่ากับ 5.4 บาทต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอาหาร YM ที่มีต้นทุนอาหาร เท่ากับ 54 บาทต่อลิตร การใช้อาหาร C5 ที่เติมสารสกัดยีสต์สามารถลดต้นทุนค่าอาหารได้ถึง 10 เท่า

Title: THE UTILIZATION OF WASTEWATER FROM FERMENTED FISH INDUSTRY FOR CAROTENOID PRODUCTION BY *RHODOTORULA MUCILAGINOSA* UP12

Author: Arawan Yamone, Thesis: M.Sc. (Biotechnology), University of Phayao, 2020

Advisor: Assistant Professor Doctor Supaporn Passorn

Keyword Carotenoid, Fermented fish production wastewater, Rhodotorula mucilaginosa UP12

ABSTRACT

Carotenoids are natural pigments with various properties as antioxidant, precursors of vitamin A production and potential prevent cell and tissue damages. It occurs in plants and microorganisms and plays the important role in human and animal health. Nowadays it is widely used in food, nutritional supplement, and animal feed industries. Therefore, the production of carotenoid with the low-cost substrate was studied in *Rhodotorula mucilaginosa* UP12. A medium containing wastewater from the fermented fish industry was investigated for carotenoid production by *R. mucilaginosa* UP12 isolated from a landfill site at the University of Phayao. These yeasts were cultured in 6 different formulas and Agitation difference 3 level 100,150 and 200 rpm with comparison to yeast malt extract (YM). The optimum conditions for carotenoid production were achieved in a C5 medium as follows: Wastewater from fermented fish industry adding 10 g/L of sucrose and 2 g/L of ammonium sulphate at pH 5.0, with an incubation temperature of 30°C and agitation at 150 rpm for Seven days. The maximum carotenoid content was equivalent to the control medium at 152.66±20.29 µg/g cell dry weight and 0.93±0.02 mg/L of total carotenoids production which higher than in C1 (only wastewater) and YM medium under the same conditions approximately 2.02 and 1.22 times, respectively. Cultivation of *R. mucilaginosa* UP12 carried out in a 5-liter laboratory bioreactor was as follows: C5 medium at pH 5.0, with an incubation temperature of 30 °C and agitation at 150 rpm Aeration 0.5 vvm for six days about 173.93 µg/g cell dry weight and 1.2 mg/L of total carotenoids production. It was 1.1 times higher than in C5 shake flask condition. Supplementation of yeast extract as organic nitrogen source to C5 medium was observed and it could enhance the carotenoid content and production in yeast about 194.83 µg/g cell dry weight and 1.5 mg/L with approximately 1.25 times higher than C5 medium. In this study, it found that growing yeast in C5-yeast extract supplemented medium, adjusted pH5 with temperature of 30 °C, agitation rate at 150 rpm, was the most efficient growth condition for production of carotenoids. The cost of C5 medium plus Yeast extract (5.4 bath/L) was lower than YM medium (54 bath/L) about 10 times. Therefore, this result showed using the C5 medium adding yeast extract was able to reduce medium cost of carotenoid production.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุภาพร ภัสสร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ เป็นอย่างยิ่งที่กรุณามอบทุนการศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา ชี้แนะแนวทางในการเรียนรู้ ให้คำแนะนำ ตลอดจนตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องจนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ดร.รวิสรา รื่นไวย์ คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ดร.สุกัญญา จีนเหนาะ ประธานคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาชี้แนะแนวทาง และคำแนะนำในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้เสร็จสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณโรงงานผลิตปลาส้ม สมศักดิ์-นงเยาว์ ที่ให้ความกรุณาช่วยเหลือด้านข้อมูล น้ำตัวอย่างที่ข้าพเจ้าใช้ในการศึกษาครั้งนี้จนสำเร็จได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ และนักวิทยาศาสตร์ ประจำสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ และศูนย์เครื่องมือกลาง มหาวิทยาลัยพะเยา ที่ให้คำปรึกษาและอำนวยความสะดวกในการดำเนินงานวิจัย สถานที่ เครื่องมือและอุปกรณ์ ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการขับเคลื่อนงานวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และคนที่คอยสนับสนุนให้กำลังใจเสมอมา จนวิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ข้าพเจ้าหวังเป็นอย่างยิ่งว่าข้อมูลในวิทยานิพนธ์เล่มนี้ จะมีประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจนำองค์ความรู้ไปต่อยอดในอนาคต

อรวรรณ ยะมนต์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ฌ

สารบัญภาพ ..... ฎ

บทที่ 1 ที่มาและความสำคัญ 14

ขอบเขตของการวิจัย 3

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย 3

บทที่ 2 เอกสารที่เกี่ยวข้อง 4

แคโรทีนอยด์ 4

ชนิดและประเภทของแคโรทีนอยด์ 5

คุณสมบัติของแคโรทีนอยด์ 6

การสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ 6

1 การสังเคราะห์ทางเคมี 6

การสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ของยีสต์ *Rhodotorula* sp. 9

คุณลักษณะของ *Rhodotorula mucilaginosa* 11

สภาวะการเลี้ยง *R.mucilaginosa* เพื่อการผลิตแคโรทีนอยด์ 13

การผลิตแคโรทีนอยด์โดย *R. mucilaginosa* และการใช้ของเสียทางการเกษตรและโรงงานอุตสาหกรรมในการผลิตแคโรทีนอยด์ 16

บทที่ 3 วิธีการดำเนินการ 18

อุปกรณ์และสารเคมี 18
1. อุปกรณ์ 18
2. อาหารสำหรับเลี้ยงยีสต์ *Rhodotorula mucilaginosa* UP12 18
3.สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ 19
วิธีการทดลอง 20
บทที่ 4 ผลและอภิปรายผลการวิจัย 25
1. องค์ประกอบทางเคมีของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำล้างปลาจากโรงงานปลาส้มเป็นองค์ประกอบ 25
2. สูตรอาหาร และความเป็นกรด–ด่าง ที่มีผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ 27
3. การศึกษาอัตราความเร็วรอบในการเขย่าต่อการผลิตแคทีนอยด์ 35
4.ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ 39
5. การขยายผลการผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 ด้วยถังหมักในระดับห้องปฏิบัติการ 44
บทที่ 5 บทสรุป 51
สรุปผลการวิจัย 51
ข้อเสนอแนะ 53
ภาคผนวก 54
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ 55
ภาคผนวก ข การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของอาหารเลี้ยงเชื้อ 56
ภาคผนวก ค ผลการวิเคราะห์ข้อมูล 58
บรรณานุกรม 67
ประวัติผู้วิจัย 77

สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติสามารถสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ 8

ตาราง 2 การผลิตแคโรทีนอยด์โดยยีสต์ *Rhodotorula sp.*จากแหล่งอาหารต้นทุนต่ำแหล่งต่าง 11

ตาราง 3 ส่วนประกอบของสูตรอาหาร YM C1 C2 C3 C4 C5 และ C6 สำหรับเลี้ยง *R. mucilaginosa* UP12 22

ตาราง 4 ค่าซีโอดีและปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ 26

ตาราง 5 ปริมาณเซลล์แห้งและปริมาณแคโรทีนอยด์ของ *R. mucilaginosa* UP12 เลี้ยงในอาหาร C1, C5 และ YM ปรับ pH 5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ 32

ตาราง 6 ปริมาณแคโรทีนอยด์ และปริมาณน้ำหนักแห้งจากการเลี้ยงยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 ในถังหมักระดับห้องปฏิการ 48

ตาราง 7 48

ตาราง 8 ปริมาณคาโบไฮเดรตทั้งหมดในอาหารที่มีระดับพีเอช เท่ากับ 4 59

ตาราง 9 ปริมาณคาโบไฮเดรตทั้งหมดในอาหารที่มีระดับพีเอช เท่ากับ 5 60

ตาราง 10 ปริมาณคาโบไฮเดรตทั้งหมดในอาหารที่มีระดับพีเอช เท่ากับ 6 60

ตาราง 11 ปริมาณคาโบไฮเดรตทั้งหมดจากการเลี้ยง *R. mucilaginosa* UP12 ด้วยความเร็วรอบเขย่า 150 รอบต่อนาที 61

ตาราง 12 ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดจากการเลี้ยง *R. mucilaginosa* UP12 ด้วยความเร็วรอบเขย่า 200 รอบต่อนาที 61

ตาราง 13 ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดจากการเลี้ยง *R. mucilaginosa* UP12 ในอาหารที่มีความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 5 และ 10 เปอร์เซ็น 62

ตาราง 14 ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด จากการศึกษาสูตรอาหาร และความเป็นกรด–ด่างที่มีผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ (ไมโครกรัมต่อกรัม) 63

ตาราง 15 น้ำหนักเซลล์แห้ง จากการศึกษาสูตรอาหาร และความเป็นกรด–ด่างที่มีผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ (กรัมต่อลิตร) 64

ตาราง 16 ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด และปริมาณน้ำหนักเซล์แห้งจากการศึกษาผลของความเร็วรอบในการเขย่าต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ 65

ตาราง 17 ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด และปริมาณน้ำหนักเซล์แห้งจากการศึกษาผลของความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ 65

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพ 1 โครงสร้างหลักแคโรทีนอยด์ 4

ภาพ 2 โครงสร้างทางเคมีของ hydrogenated carotenoid derivatives..... 5

ภาพ 3 โครงสร้างทางเคมีของ oxygenated carotenoid derivatives..... 6

ภาพ 4 การสังเคราะห์ไอโซพีนอยด์ในเซลล์พืช..... 7

ภาพ 5 การสังเคราะห์ทางชีวภาพแคโรทีนอยด์ ของยีสต์ *Rhodotorula sp.*..... 10

ภาพ 6 ลักษณะโคโลนีบนจานอาหารของ *Rhodotorula mucilaginosa* 12

ภาพ 7 ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของ *Rhodotorula mucilaginosa* 12

ภาพ 8 การเก็บตัวอย่างน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตปลาส้มสมศักดิ์นงเยาว์ บ้านสันเวียงใหม่ ขั้นตอนการล้างปลาในกระบวนการผลิตปลาส้ม(ก) ลักษณะของน้ำทิ้งที่รวบรวมนำมาใช้ในการทดลอง (ข)..... 20

ภาพ 9 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 บนจานอาหาร yeast malt agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 96 ชั่วโมง (ก) ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 100x (ข)..... 20

ภาพ 10 ปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ได้จากยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 ที่เลี้ยงในอาหาร สูตรต่าง ๆ ที่ปรับพีเอช เท่ากับ 4 (ก) 5 (ข) 6 (ค)..... 29

ภาพ 11 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดในอาหารสูตร C1 C2 C3 C4 C5 C6 และ YM ที่ปรับพีเอช เท่ากับ 4 (ก 1) 5 (ข 1) และ 6 (ค 1) ระหว่างการเลี้ยงเพื่อผลิตแคโรทีนอยด์ และน้ำหนักเซลล์แห้งในอาหารสูตร C1 C2 C3 C4 C5 C6 และ YM ที่ปรับพีเอช เท่ากับ เท่ากับ 4 (ก 2) 5 (ข 2) และ 6 (ค 2)..... 30

ภาพ 12 ตัวอย่างการเจริญของ *R. mucilaginosa* UP12 ในอาหาร C1 C5 และ YM ที่มีความเป็นกรด–ด่าง เท่ากับ 4 5 และ 6 ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน..... 33

ภาพ 13 ตัวอย่างการเจริญของยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 ในอาหารC5 และ YM บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ที่ความเร็วรอบ 100 150 และ 200 รอบต่อนาที 35

ภาพ 14 ปริมาณแคโรทีนอยด์ในเซลล์ยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 ที่เลี้ยงในความเร็วรอบเขย่า 100 150 และ 200 รอบต่อนาที ในวันที่ 5 และวันที่ 7 โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ 36

ภาพ 15 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 ที่เลี้ยงในความเร็วรอบเขย่า 100 150 และ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลาเวลา 5 วัน โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ 37

ภาพ 16 ตัวอย่างการเจริญของยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 ในอาหาร C5 และ YM ที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน 39

ภาพ *17* ปริมาณแคโรทีนอยด์ในเซลล์ยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 ในอาหาร C5 และ YM ที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 และ 7 วัน 40

ภาพ 18 น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 ที่เลี้ยงในอาหารC5 และ YM ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 วัน โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ 41

ภาพ 19 ตัวอย่างการเจริญของ *R. mucilaginosa* UP12 โดยใช้อาหาร C5 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ก่อนเติมหัวเชื้อ (ก) และหลังเติมหัวเชื้อเป็นเวลา 5 วัน (ข).....44

ภาพ 20 ตัวอย่างการเจริญ *R. mucilaginosa* UP12 โดยใช้อาหาร C5 ที่ได้จากถังหมัก เป็นเวลา 7 วัน 45

ภาพ 21 อัตราการเจริญของยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 วัดอัตราการเจริญโดยการวัดค่าดูกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ทุก 1ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง.....45

ภาพ 22 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดในอาหารระหว่างการผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 เป็นเวลา 7 วัน.....46

ภาพ 23 การย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 บนอาหาร Blood agar บ่มอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง 58

ภาพ 24 กราฟมาตรฐานกลูโคสที่มีความเข้มข้น 40 80 120 160 และ 200 ไมโครกรัมต่อ 200 ไมโครลิตร.....59

ภาพ 25 กราฟมาตรฐานกลูโคสที่มีความเข้มข้น 40 80 120 160 และ 200 ไมโครกรัมต่อ 200 ไมโครลิตร.....62

บทที่ 1

ที่มาและความสำคัญ

แคโรทีนอยด์ (Carotenoid) คือ สารรงควัตถุ สีเหลือง สีแดง สีส้มแดง ที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ปัจจุบันในระดับอุตสาหกรรมอาหารและอาหารสัตว์มีความต้องการบีต้า-แคโรทีน และแอสต้าแซนทีนเป็นอย่างมาก เนื่องจากเป็นสารตั้งต้นของไวตามินเอ (Pro vitamin A) (สิรินดา ยุ่นฉลาด และพิพัฒน์ รวมตะคุ, 2551)และยังเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ลดความเสียหายของเซลล์และเนื้อเยื่อ ซึ่งแคโรทีนอยด์สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ การผลิตและสกัดแคโรทีนอยด์สามารถทำได้ทั้งในพืชและจุลินทรีย์ การผลิตแคโรทีนอยด์จากพืชมีข้อจำกัดด้านเวลา ฤดูกาล พื้นที่เพาะปลูก และขั้นตอนที่ซับซ้อนในการสกัด ซึ่งต่างจากการใช้จุลินทีย์ ที่มีขั้นตอนการสกัดที่ง่ายกว่าเนื่องจากเซลล์ของจุลินทรีย์เป็นเซลล์ที่มีองค์ประกอบไม่ซับซ้อน อีกทั้งยังสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ได้อย่างรวดเร็ว จึงเป็นตัวเลือกที่ดีในการผลิตแคโรทีนอยด์ในระดับอุตสาหกรรมจุลินทรีย์สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้มีหลายชนิดส่วนใหญ่จะผลิตได้จาก เชื้อรา ยีสต์ และแบคทีเรีย ไลแคนบางชนิด ในช่วงปีที่ผ่านมามีการศึกษาการผลิตแคโรทีนอยด์จากยีสต์ *Rhodotorula sp.* ในสปีชีส์ต่าง ๆ โดยพบว่าอุปสรรคสำคัญมาจากปัญหาด้านต้นทุนที่เกิดจากการนำสารประกอบต่าง ๆ มาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตแคโรทีนอยด์ จึงเกิดการศึกษาวิจัยการผลิตแคโรทีนอยด์จากยีสต์ในกลุ่ม *Rhodotorula sp.* โดยใช้ของเสียในแหล่งต่าง ๆ เช่น การใช้กลีเซอรีนจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล และน้ำข้าวโพดเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมในประเทศบราซิลเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในการผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์ *Rhodotorula Glutinis* UCP1555 (Andrade et al., 2016) และการใช้กากน้ำตาล และของเสียจากโรงานซอสมะเขือเทศในการผลิตแคโรทีนอยด์จากยีสต์ *R.mucilaginosa* F-1 นอกจากนี้มีการรายงานการคัดแยกยีสต์ในกลุ่มแคโรทีโนจีนิคจากดินในเขตมหาวิทยาลัยพะเยา พบว่าสายพันธ์ของยีสต์ที่ผลิตแคโรทีนอยด์สูงที่สุดในการรายงานนี้คือ *R. mucilaginosa* UP12 (สุภาพร ภัสสร, นิตยา สุขวรรณา และพนิตนาฏ อู่พุฒินันท์, 2559) ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่สนใจนำมาศึกษาการผลิตแคโรทีนอยด์ในครั้งนี้

หลายพื้นที่ในจังหวัดพะเยามีการจัดตั้งวิสาหกิจชุมชนในทำปลาส้ม การผลิตปลาส้มของจังหวัดพะเยาถือว่าเป็นการผลิตในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งในกระบวนการผลิตปลาส้มในแต่ละวันมีการใช้น้ำมากถึง 500-800 ลิตร (ข้อมูลวันที่ 5 กรกฎาคม 2562 โรงงานปลาส้ม

สมศักดิ์นงเยาว์ บ้านสันเวียงใหม่) ขั้นตอนที่ใช้น้ำมากที่สุด คือ ขั้นตอนของการล้างเนื้อปลา ซึ่งน้ำที่ได้จากการล้าง มีเลือด โปรตีน ไขมัน ซึ่งเป็นองค์ประกอบของปลา และมีรายงานองค์ประกอบทางเคมีของน้ำเสีย จากโรงงานปลาส้มในปี 2556 (โรงงานปลาส้มศรีทน) กล่าวว่ามี BOD เท่ากับ 764 มิลลิกรัมต่อลิตร COD เท่ากับ 212.16 มิลลิกรัมต่อลิตร ไนโตรเจนทั้งหมด 19.60 มิลลิกรัมต่อลิตร ไขมันและน้ำมัน เท่ากับ 160.40 มิลลิกรัมต่อลิตร (คมกฤต เมฆสกุล และพิมพ์ศิริ สุวรรณพัฒน์, 2556) จากรายงานนี้จะเห็นได้ว่าน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมปลาส้ม มีปริมาณสารอาหารที่สามารถใช้เป็นอาหารเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ได้ ผู้วิจัยจึงมีความสนใจนำยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 จากการรายงานของ สุภาพร และคณะที่คัดแยกได้ในปี 2556 มาผลิตแคโรทีนอยด์ และนำน้ำทิ้งในขั้นตอนการล้างปลาจากโรงงานอุตสาหกรรมผลิตปลาส้มในจังหวัดพะเยามาใช้ประโยชน์ โดยมีวัตถุประสงค์หลักเพื่อศึกษาความเหมาะสมของการใช้น้ำทิ้งมาเป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 เพื่อผลิตแคโรทีนอยด์ในครั้งนี้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาสูตรอาหารและสภาวะที่เหมาะสมเพื่อการผลิตแคโรทีนอยด์จากยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 โดยมีน้ำล้างปลาจากโรงงานปลาส้มเป็นองค์ประกอบ ร่วมกับการเติมแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนเพิ่มเติม

2. การขยายการผลิตแคโรทีนอยด์จากยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 ในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ

สมมติฐานการวิจัย

น้ำล้างปลาจากโรงงานปลาส้มมีสารประกอบอินทรีย์ที่สามารถนำมาใช้เป็นอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อประโยชน์ในการผลิตแคโรทีนอยด์ได้

ขอบเขตของการวิจัย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

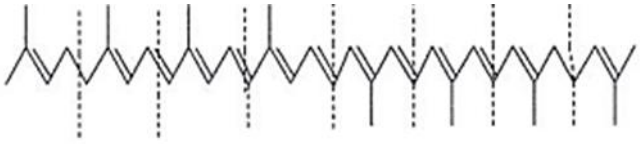
สามารถนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของน้ำทิ้งจากโรงงานปลาส้ม ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตแคโรทีนอยด์มาใช้ในระดับอุตสาหกรรมเพื่อลดต้นทุนการผลิต

บทที่ 2

เอกสารที่เกี่ยวข้อง

แคโรทีนอยด์

แคโรทีนอยด์ คือ สารทุติยภูมิในกลุ่มเทอร์ปีนอยด์ เป็นอนุพันธ์ของไขมัน ที่ไม่ละลายน้ำแต่ละลายได้ในตัวทำละลายไขมัน เช่น อะซิโตน (acetone) แอลกอฮอล์ (alcohol) ไดเอทิลอีเทอร์ (dietyl ether) และ คลอโรฟอร์ม (chloroform) เป็นต้น (Fox and Vevers, 1960) แคโรทีนอยด์ชนิดที่เป็นแคโรทีน ละลายได้ดีในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว เช่น ปิโตรเลียม อีเทอร์ (petroleum ether) และ เฮกเซน (hexane) ชนิดที่เป็นแซนโทฟิลล์ ละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้ว เช่น แอลกอฮอล์ แคโรทีนอยด์มีความคงทนต่อความเป็นกรดและด่าง แต่ไวต่อแสงแดดและความร้อน ซึ่งเป็นตัวเร่งให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่น (Simpson, Nakayama and Chichester, 1964) แคโรทีนอยด์ที่พบในอาหารส่วนใหญ่มักอยู่ในรูปเตตระเทอร์ปีนอยด์ที่ประกอบด้วยคาร์บอน 40 อะตอม (C40 tetraterpenoids) ซึ่งถูกสร้างขึ้นจากหน่วยย่อยไอโซพรีนอยด์ (C5 isoprenoid units) จำนวน 8 หน่วย เชื่อมต่อกันด้วยพันธะโควาเลนต์แบบหัวต่อหาง (head–to–tail) ยกเว้นที่ตำแหน่งตรงกลางของโมเลกุลที่การเชื่อมต่อเป็นแบบหางต่อหาง (tail–to–tail) และมีลำดับการเชื่อมต่อแบบผันกลับจึงทำให้โมเลกุลมีความสมมาตร การเชื่อมต่อกันระหว่างพันธะเดี่ยวสลับกับพันธะคู่ (conjugated system) เกิดเป็นสายโซ่โพลิอีน (polyene chain) ทำให้แคโรทีนอยด์มีคุณสมบัติในการดูดกลืนคลื่นแสงส่งผลให้สารในกลุ่มนี้เป็นสารที่มีสี ตัวอย่างโมเลกุลของสารให้สีใน กลุ่มแคโรทีนอยด์ที่มีความซับซ้อนน้อยที่สุด คือ โมเลกุลของไลโคพีน (lycopene) และบีตาแคโรทีน (β–carotene) ซึ่งมีโครงสร้างเป็นเส้นตรง (acyclic carotenoid) และมีวงแหวนอยู่ในโมเลกุล (dicyclic carotenoid) ตามลำดับ

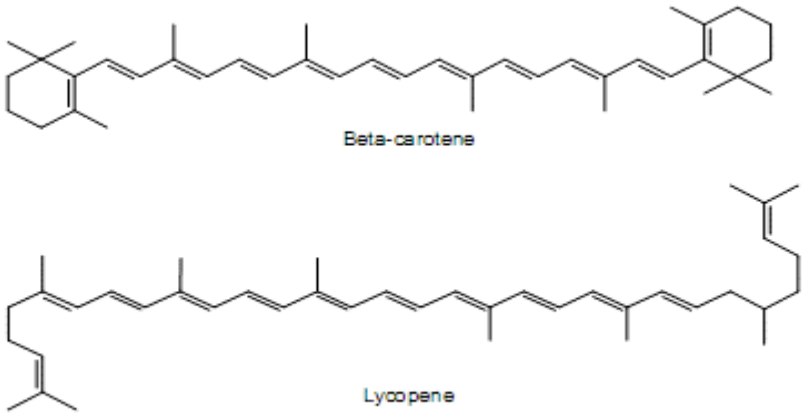


ภาพ 1 โครงสร้างหลักแคโรทีนอยด์

ที่มา : (Bhosale และGadre, 2001)

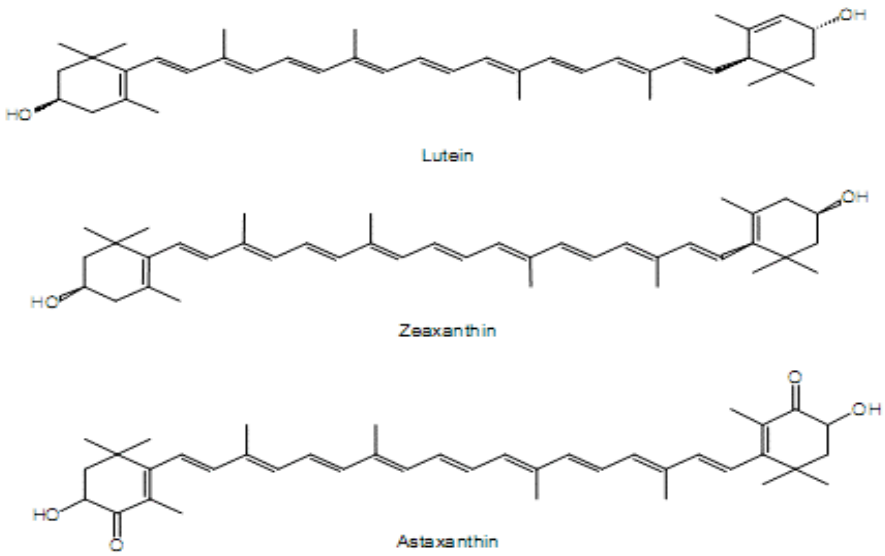
ชนิดและประเภทของแคโรทีนอยด์

สามารถจำแนกแคโรทีนอยด์เป็น 2 กลุ่ม คือ hydrogenated (ภาพที่ 2) และ oxygenated carotenoid derivatives (ภาพที่ 3) โดยกลุ่ม hydrogenated carotenoid derivatives หรือกลุ่มแคโรทีน (carotene) เป็นโมเลกุลที่ประกอบด้วยสายไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon) ทำให้เป็นสารไม่มีขั้วและละลายได้ในไขมัน ตัวอย่างแคโรทีนอยด์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ เบตาแคโรทีน และ ไลโคพีน เป็นต้น ส่วนกลุ่มที่ 2 คือกลุ่ม oxygenated carotenoid derivatives หรือกลุ่มแซนโทฟิล (xanthophyll) นั้น มีอะตอมของออกซิเจนอยู่ในโมเลกุล จึงมีขั้วมากกว่าและละลายในไขมันได้น้อยกว่าแคโรทีนอยด์กลุ่มแรก ตัวอย่างแคโรทีนอยด์ในกลุ่มนี้ได้แก่ ลูทีน (lutein) ซีแซนทิน (zeaxanthin) และ แอสตาแซนทิน (Simpson, Nakayama and Chichester, 1964)



ภาพ 2 โครงสร้างทางเคมีของ hydrogenated carotenoid derivatives

ที่มา: (Fox และVevers, 1960)



ภาพ 3 โครงสร้างทางเคมีของ oxygenated carotenoid derivatives

ที่มา: (Fox และVevers, 1960)

คุณสมบัติของแคโรทีนอยด์

1. เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ไวตามิน เอ (Pro-vitamin A)
2. สารต้านออกซิเดชั่น (Antioxidant)
3. ลดความเสี่ยงการเกิดโรคมะเร็งชนิดต่าง ๆ

การสังเคราะห์แคโรทีนอยด์

การผลิตแคโรทีนอยด์แบ่งออกเป็น 2 วิธี คือ การสังเคราะห์ทางเคมี และการสังเคราะห์ทางชีวภาพ

1 การสังเคราะห์ทางเคมี

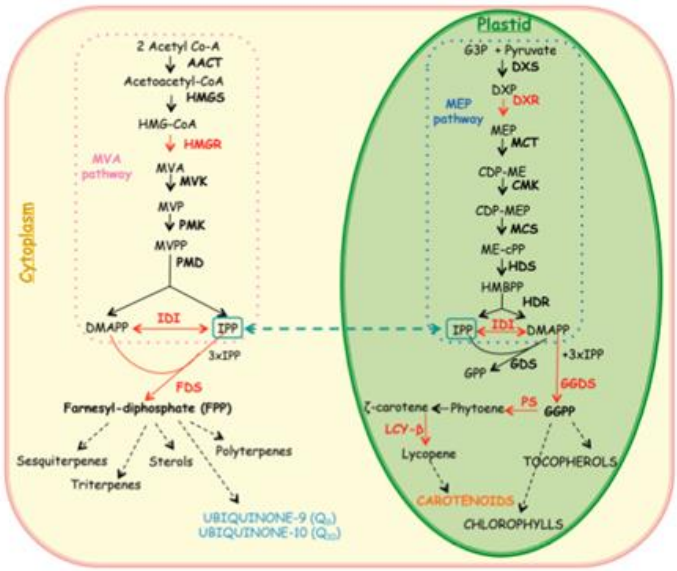
ในทางอุตสาหกรรมส่วนใหญ่ การผลิตแคโรทีนอยด์ได้จากการสังเคราะห์ด้วยสารเคมี เนื่องจากมีต้นทุนการผลิตที่ต่ำ สามารถผลิตได้จำนวนมาก และเพียงพอต่อความต้องการ แต่การสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ทางเคมียังคงมีข้อจำกัดในการผลิต เนื่องจากวิธีการผลิตยุ่งยากซับซ้อน และมีรายงานว่าแคโรทีนอยด์ที่สังเคราะห์โดยวิธีทางเคมีและทางชีวภาพมีความแตกต่างด้านโครงสร้าง ซึ่งส่งผลต่อประสิทธิภาพในการใช้งาน เช่น การผสมในอาหารสัตว์ พบว่า สัตว์ดูดซึมไม่ดีเท่าแคโรทีนอยด์จากการสังเคราะห์ทางชีวภาพ (นฤมล ใบพัด, 2546)

2. การสังเคราะห์ทางชีวภาพ

ในปัจจุบันการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ทางชีวภาพ ถือเป็นวิธีที่นิยมและได้รับความสนใจเป็นอย่างมาเนื่องจาก สามารถผลิตได้จากหลากหลายแหล่ง ทั้งพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ซึ่งผู้บริโภคในยุคปัจจุบันมีความสนใจและหลีกเลี่ยงการใช้สารสังเคราะห์ทางเคมีเพิ่มมากขึ้น

2.1 การสังเคราะห์แคโรทีนอยด์จากพืช

แคโรทีนอยด์เป็นสารพวกเทอร์ปีน หรือเทอร์ปีนอยด์ และในเทอร์ปีนอยด์ของเซลล์พืชได้มาจากกระบวนการชีวสังเคราะห์ 2 กระบวนการ คือ cytosolic mevalonate (MVA) และ plastidial MVA-independent pathway กระบวนการทั้งสองทำงานได้อย่างอิสระในพืช และมีการสื่อสารแลกเปลี่ยนของตัวกลางระหว่าง cytosolic และ plastidial pathways ใน plastidial terpenoid (ภาพที่ 4) แคโรทีนอยด์ในพืช พบได้ทั่วไปในผักและผลไม้ ชนิดที่พบมากที่สุดในผักและผลไม้คือ บีต้าแคโรทีน เช่น มะละกอ ส้ม แครอท ฟักทอง และมะเขือเทศ เป็นต้น ในผักผลไม้ส่วนใหญ่มีบีต้าแคโรทีน ประมาณ 46-615 ไมโครกรัม ต่อ 100 กรัมสด (Bhosale and Gadre, 2001)



ภาพ 4 การสังเคราะห์ไอโซพีนอยด์ในเซลล์พืช

ที่มา: (Rizzello et al., 2014)

2.2 การสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ในสัตว์

สัตว์ไม่สามารถสังเคราะห์แคโรทีนอยได้ แต่สามารถสะสมแคโรทีนอยด์จากอาหารที่ได้รับ ตัวอย่างของสัตว์ที่สะสมแคโรทีนอยด์ได้ คือ สัตว์ในกลุ่มครัสตาเชียน ได้แก่ กุ้ง กั้ง และปู เป็นต้น ซึ่งชนิดของแคโรทีนอยด์ที่พบมากที่สุดในสัตว์กลุ่มนี้ คือ แอสตาแซนทีน บีต้าแคโรที

นครีปโตแซนทีน แคโรทีนอยด์จะถูกดูซึมร่วมกับไขมัน ไปสะสมยังส่วนต่างๆ เช่น ตา ไข่ เปลือก และอวัยวะสืบพันธุ์ (Trevor Walworth Goodwin, 1980)

2.3 การสังเคราะห์แคโรทีนอยด์จากจุลินทรีย์

การสังเคราะห์แคโรทีนอยด์จากจุลินทรีย์ เป็นวิธีที่ได้รับความสนใจนำมาศึกษาเป็นอย่างมาในปัจจุบัน จุลินทรีย์ในแต่ละชนิดจะมีความสามารถในการผลิตแคโรทีนอยด์ต่างชนิดกันไป ซึ่งจุลินทรีย์ที่ได้รับความสนใจนำมาผลิตแคโรทีนอยด์ได้แก่ ยีสต์ และเชื้อรา เป็นส่วนใหญ่ นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรียและสาหร่ายบางชนิดที่ได้รับความสนใจนำมาผลิตแคโรทีนอยด์ (ตาราง 1) ยีสต์ที่นิยมนำมาผลิตในเชิงการค้าในช่วงปี 2000 คือ *Phaffia rhodozyma* เป็นยีสต์ที่สามารถสังเคราะห์แอสตาแซนทีนได้ เนื่องจากแอสตาแซนทีนจากแหล่งธรรมชาติ มีมูลค่าถึง 2,500–3,000 ดอลล่าร์สหรัฐ ต่อ 1 กิโลกรัม (นฤมล ใบพัด, 2546) และยีสต์อีกชนิดที่ได้รับความสนใจนำมาศึกษา คือ *Rhodotorula* spp. ซึ่งสามารถผลิตแคโรทีนอยด์ชนิดโทลูอีน โทรูลาโรดิน และบีต้าแคโรทีนได้อีกด้วย (Perrier, Dubreucq and Galzy, 1995)

ตาราง 1 จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติสามารถสังเคราะห์แคโรทีนอยด์

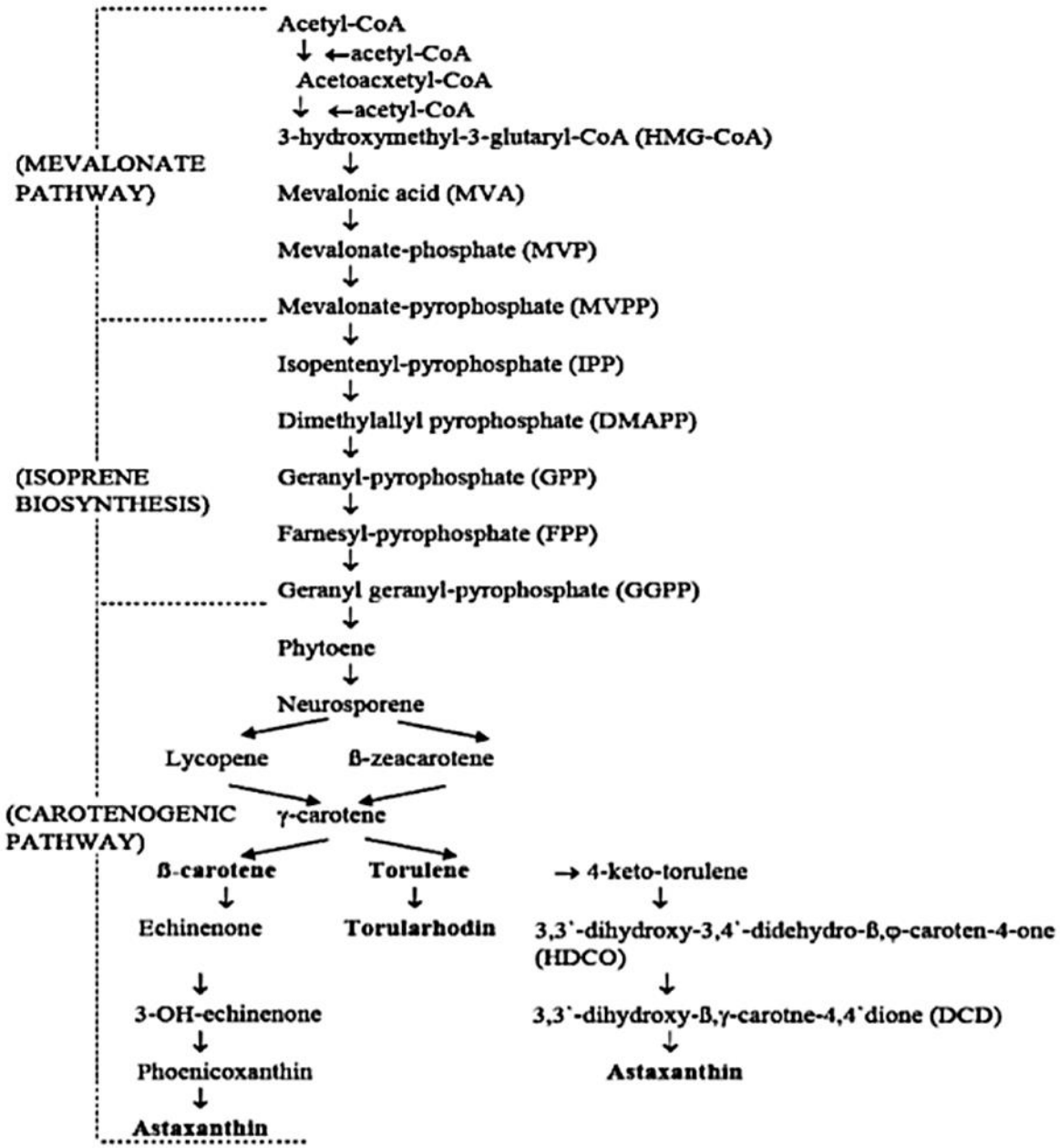
Family	Name of microbial	Source
Yeast	*Rhodotorula acheniorum*	(Nasrabadi and Razavi, 2011)
	Rhodotorula glutinis	(Petrik et al., 2013)
	Rhodotorula gracilis	(Somashekar and Joseph, 2000)
	Rhodotorula graminis	(Maldonade,Rodriguez–Amaya
	Rhodotorula minuta	and Scamparini, 2012)
	Rhodotorula rubra (mucilaginosa)	(Patiño–Vera et al., 2005)
	Rhodosporidium diobovatum	(Chanchay et al., 2012)
	Sporidiobolus pararoseus	(Nasirian et al., 2018)
	Sporobolomyces ruberrimus	(Valduga et al., 2014)
	Sporobolomyces shibatanus	(Razani et al., 2007)
	Sporobolomyces roseus	(Marova et al., 2012)
	Sporobolomyces pararoseus	(Petrik et al., 2013)
	Candida utilis	(Charles H. Fuchman, 1980)

ตาราง 1 จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติสามารถสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ (ต่อ)

Family	Name of microbial	Source
Mold	*Blakeslea trispora*	(Nanou, Roukas and Papadakis, 2012)
	Phycomyces blakesleeanus	(Mehta et al., 1997)
Algae	*Dunaliella salina*	(García–González et al., 2005)
	Dunaliella bardawil	(Rabbani et al., 1998)
	Dunaliella tertiolecta	(Fazeli et al., 2006)
	Erythrotrichia carnea	(Bjørnland, 1984)
	Prochloron sp	(Takaichi et al., 2012)
	Spirulina platensis Chrysophycea	(Dey and Rathod, 2013)
Bacteria	*Escherichia coli*	(Zhao et al., 2013)
	Serratia marcescens	(Wang et al., 2012)
	Agrobacterium tumefaciens	(Misawa, Yamano and Ikenaga, 1991)

การสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ของยีสต์ *Rhodotorula* sp.

Buzzini et al. (2007) ได้ศึกษาเส้นทางการสังเคราะห์ทางชีวภาพของแคโรทีนอยด์ ระบุว่า *R. minuta R. glutinis R. graminis R. mucilaginosa* และ *Rhodotorula sp.* อื่นๆ มีการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ ชนิด แกมมา–แคโรทีน บีต้า–แคโรทีน โทลูอีน และโทรูลาโรดีน เป็นหลัก ซึ่งมีการสังเคราะห์ โดยการรวมตัวของหน่วยไอโซพีนอยด์ เป็นไฟโตอีนซึ่งเป็นแคโรทีนอยด์ที่ไม่มีสีเป็นตัวแรกในกระบวนการสังเคราะห์ ไฟโตอีนจะถูกทำปฏิกิริยาดีไฮโดรจิเนตอย่างต่อเนื่องและคอนจูเกต พันธะคู่ ไปจนถึงการก่อตัวของ นิวโรสปอรีน และไลโคปีน โดยมีสองเส้นทาง คือ เปลี่ยนไปเป็น แอลฟา–แคโรทีน หรือ โทรูอีนโดยตรง ซึ่งจะถูกเปลี่ยนไปเป็น บีต้า–แคโรทีน และโทรูลาโรดีน (ภาพ 4) (Tang et al., 2019)



ภาพ 5 การสังเคราะห์ทางชีวภาพแคโรทีนอยด์ ของยีสต์ *Rhodotorula sp.*

ที่มา: (Frengova and Beshkova, 2009)

การผลิตแคโรทีนอยด์จากยีสต์ถือเป็นแหล่งที่สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ที่มีศักยภาพแหล่งหนึ่ง ซึ่งนิยมนำมาผลิตเนื่องจาก ยีสต์เป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียว รูปแบบโครงสร้างของเซลล์ไม่ซับซ้อน สามารถเลี้ยงง่าย มีอัตราการเจริญเติบโตรวดเร็ว ทนต่อสภาวะแวดล้อมต่างๆ ได้ดี มีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนแหล่งไนโตรเจนได้อย่างหลากหลาย ซึ่งยีสต์ในกลุ่ม *Rhodotorula sp.* ได้รับความสนใจหลายสายพันธุ์(ตารางที่ 2) เนื่องจากแต่ละชนิดจะมีความสามารถในการผลิตแคโรทีนอยด์ในชนิดที่ต่างกัน สายพันธุ์ที่สำคัญที่ได้รับความสนใจในการนำมาศึกษาได้แก่ *R. mucilaginosa* (Domíguez-Bocanegra and Torres-Muñoz, 2004; Tinoi, Rakariyatham and Deming, 2005)

ตาราง 2 การผลิตแคโรทีนอยด์โดยยีสต์ *Rhodotorula sp.*จากแหล่งอาหารต้นทุนต่ำแหล่งต่าง

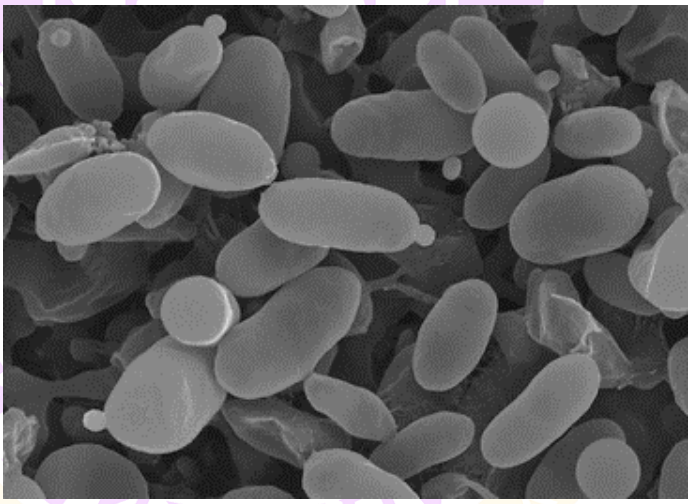
Auther	Substrate	Yeast	Yield
(Marova et al., 2012)	Potato medium	*R. mucilaginosa*	56 mg/L of β carotene
(Marova et al., 2012)	whey	*R. glutinis*	46 mg/L of β carotene
(Saenge et al., 2011))	Crude glycerol	*R. glutinis*	135.2 mg/L of carotenoid
(Taskin and Erdal, 2011)	Chicken feathers	*R. glutinis*	92 mg/L of carotenoid
(Nasrabadi and Razavi, 2011)	Whey altrafiltrate	*R. acheniorum*	262 mg/Lβ -carotene
(Malisorn and Suntornsuk, 2008)	Fermented radish	*R. glutinis*	201 μg/L of β -carotene
(Frengova and Beshkova, 2009)	Whey altrafiltrate	R. glutinis	10.2 mg/L of carotenoid

คุณลักษณะของ *Rhodotorula mucilaginosa*

Rhodotorula mucilaginosa เป็นยีสต์ที่จัดอยู่ในอาณาจักร Fungi กลุ่ม Basidiomycota คลาส Microbotryomycetes แฟมิลี Sporidiobolaceae จีนัส Rhodotorula สปีชีส์ mucilaginosa ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *R. mucilaginosa* คือ มีลักษณะโคโลนีบนจานอาหาร เป็นโคโลนีรูปร่างกลมสีชมพู-แดง ผิวหน้าเรียบมันวาว เป็นเมือก (ภาพที่ 5) ลักษณะสัณฐานภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (ภาพที่ 6) เซลล์รูปร่างเป็นวงรี (oval shape) มีการสืบพันธุ์แบบแตกหน่อ (budding) และมีการศึกษาการผลิตแคโรทีนอยด์โดยยีสต์ *R. mucilaginosa* เป็นจำนวนมาก เนื่องจากเป็นยีสต์ที่ได้รับการรายงานแล้วว่าให้ผลผลิตแคโรทีนอยด์ในปริมาณสูง จึงเป็นที่สนใจนำมาศึกษาการผลิตแคโรทีนอยด์จากของเสียในแหล่งต่างๆ เช่นของเสียทางการเกษตร และโรงงานอุตสาหกรรม

ภาพ 6 ลักษณะโคโลนีบนจานอาหารของ *Rhodotorula mucilaginosa*

ที่มา : (David Ellis, 2019)



ภาพ 7 ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของ *Rhodotorula mucilaginosa*

ที่มา: (David Ellis, 2019)

สภาวะการเลี้ยง *R.mucilaginosa* เพื่อการผลิตแคโรทีนอยด์

Naghavi Hanachi and Parichehr Sabora (2014) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์ *R. mucilaginosa* ศึกษาการเลี้ยงแบบเขย่าฟลาสก์ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที โดยใช้อาหาร Semi-synthetic medium (SSM) ซึ่งมีส่วนผสมของ กลูโคส 10 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียม ไดไฮโดรเจน ฟอสเฟต 2 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร แคลเซียมคอลไรด์ 0.1 กรัมต่อลิตร และสารสกัดจากยีสต์ 1 กรัมต่อลิตรพบว่า สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์ *R. mucilaginosa* คือ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ได้ปริมาณแคโรทีนอยด์ และน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 3.40±0.226 มิลลิกรัมต่อกรัม และ 3.93±0.003 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และพีเอชที่เหมาะสม เท่ากับ 5 ได้ปริมาณแคโรทีนอยด์ และน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 16.33±1.388 มิลลิกรัมต่อกรัม และ 3.930±0.035 กรัมต่อลิตร การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์นี้ไม่เหมาะสมในการผลิตเม็ดสีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมเกลือโซเดียมคลอไรด์ในทุกความเข้มข้น

Chanchay et al. (2012) ศึกษาสภาวะที่เหมาสมโดยการเติมแหล่งคาร์บอน กลูโคส และซูโครส ปริมาณ 10 กรัมต่อลิตร แหล่งไนโตรเจน แอมโมเนียมซัลเฟต ((NH4)2SO4) และแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH4Cl) ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร และปัจจัยที่ส่งเสริมการเจริญ คือ สารสกัดจากยีสต์ และเปปโตน ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตรลงในอาหาร basal medium ที่พีเอช เท่ากับ 5.5 เพาะเลี้ยงในอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า กลูโคส แอมโมเนียมซัลเฟต และสารสกัดจากยีสต์ ให้ปริมาณแคโรทีนอยด์สูงที่สุด เท่ากับ 15.63 15.63 และ 30.39 ไมโครกรัมต่อกรัม ตามลำดับ

Maldonade, Rodriguez-Amaya and Scamparini. (2012) ศึกษาความเข้มข้นของกลูโคส สารสกัดจากยีสต์ แมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO4.7H2O) และไดไฮโดรเจนโปแทสเซียมฟอสเฟต (KH2PO4) โดยการผสมเป็นสูตรอาหารที่มีความเข้มข้นของเนื้อสารแต่ละชนิดต่างกันและพีเอชต่างกัน โดยเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน พบว่าในสูตรอาหารที่มีพีเอช 6 และมีองค์ประกอบของกลูโคส 40 กรัมต่อลิตร สารสกัดจากยีสต์ 5 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณแคโรทีนอยด์สูงที่สุด เท่ากับ 904 ไมโครกรัมต่อลิตร และปริมาณเซลล์แห้ง เท่ากับ 5.6 กรัมต่อลิตร

Leyton et al. (2019) ศึกษาการใช้สารสกัดสาหร่ายทะเล (*Macrocystis pyrifera*) (โปรตีน 15 เปอร์เซ็นต์ต่อมวล คาร์โบไฮเดรต 20 เปอร์เซ็นต์ต่อมวล(น้ำตาลในส่วนของคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ ทรีฮาโลส (78%) แมนนิทอล (9.9%) และกลูโคส (8.4%)) เป็นสารอาหารในการผลิตแคโรทีนอยด์ และศึกษาสภาวะในการเลี้ยงด้วยการออกแบบการทดลองด้วยวิธี

Box–Behnken ความเข้มข้นของสารสกัดสาหร่ายทะเล 10 25 และ 40 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาตร สารสกัดยีสต์ 2 4 และ 6 กรัมต่อลิตร ระดับพีเอช 7 บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเลี้ยง 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 9 วัน เปรียบเทียบผลการทดลองในวันที่ 3 6 และ 9 พบว่า เมื่อเลี้ยงยีสต์ *R. mucilaginosa* ในอาหารที่มีความเข้มข้นสารสกัดสาหร่ายทะเล 25 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาตร สารสกัดยีสต์ 4 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 วัน มีปริมาณแคโรทีนอยด์สูงสุด เท่ากับ 1.84 ±0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 4.9±0.03 กรัมต่อลิตร

Machado et al. (2019) ศึกษาการปรับปรุงกระบวนการทางกายภาพ และโภชนาการในการผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์ *R. mucilaginosa* ในอาหารเหลว YM โดยออกแบบการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงด้วยวิธีทางสถิติ central composite design (CCD) กำหนดความเร็วรอบ 130 ถึง 230 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 ถึง 35 องศาเซลล์เซียส และศึกษาปริมาณสารอาหารจากสูตรอาหาร YM ที่เหมาะสมต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ กลูโคส 10 ถึง 30 กรัมต่อลิตร สารสกัดยีสต์ 1 ถึง 5 กรัมต่อลิตร เปปโตน 1 ถึง 10 กรัมต่อลิตร และสารสกัดมอลต์ 1 ถึง 5 กรัมต่อลิตร ระดับพีเอช 4 ถึง 6 อุณภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเขย่า 130 รอบต่อนาที เป็นเวลา 144 ชั่วโมง พบปริมาณแคโรทีนอยด์สูงสุด เมื่อเลี้ยงในอาหาร YM ที่มีกลูโคส 30 กรัมต่อลิตร สารสกัดมอลต์ 10 กรัมต่อลิตร สารสกัดยีสต์ 2 กรัมต่อลิตร และเปปโตน 3 กรัมต่อลิตร เท่ากับ 252.99 ไมโครกรัมต่อกรัม

การเพิ่มความเครียดของเซลล์เพื่อเหนี่ยวนำการผลิตแคโรทีนอยด์

Mahmoud et al. (2014) ศึกษาปัจจัยความเครียดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 0 3 5 10 15 20 25 และ 30 มิลลิโมลาร์ เมทิลีนบลูความเข้มข้น 0.0 0.1 0.25 และ 0.5 มิลลิโมลาร์ เกลือโซเดียมคลอไรด์ 0 ถึง 6 เปอร์เซ็นต์ และรังสีอัลตร้าไวโอเลต จากหลอดไฟ T–8M ultraviolet–B (ขนาด 8 วัตต์ 220 โวลต์ ความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร) ต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์ *Rhodotorula glutinis* DBVPG #4400 ในอาหารเหลว YM บ่มอุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเขย่า 130 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 วัน พบว่าการเลี้ยงในอาหารที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงที่สุด เท่ากับ 212±10 ไมโครกรัมต่อกรัม น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 1.5±0.1 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

Marova et al. (2004) ศึกษาผลของความเครียดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ของ *R. rubra* ในอาหารที่มีกลูโคส 30 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 4 กรัมต่อลิตร โมโนโพแทสเซียมฟอตเฟต 4 กรัมต่อลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟต 4 กรัมต่อลิตร ที่มีความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 10 มิลลิโมลาร์(เติมในระยะเริ่มต้นการเจริญ และระยะการเจริญแบบทวีคูณ) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 80 ชั่วโมง พบว่า ในอาหารที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณบีต้า-แคโรทีน เท่ากับ 0.59±0.31 และ 0.22±0.05 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเปรียบเทียบปริมาณแคโรทีนอยด์จากการเลี้ยงในชุดควบคุม มีปริมาณ บีต้า-แคโรทีน เท่ากับ 0.08 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง การเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ สามารถผลิตบีต้า-แคโรทีนได้สูงกว่าชุดควบคุม เท่ากับ 7.4 และ 2.8 เท่า ตามลำดับ ซึ่งการเลี้ยงในอาหารที่เติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 10 มิลลิโมลาร์(เติมในระยะเริ่มต้นการเจริญ และระยะการเจริญแบบทวีคูณ) สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ เท่ากับ 0.14 และ 0.12 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้งสามารถผลิตบีต้า-แคโรทีนได้สูงกว่าชุดควบคุม เท่ากับ 1.8 และ 1.5 เท่า ตามลำดับ

Carnecka et al. (2010) ศึกษาผลของความเครียดจากการฉายรังสีอัลตร้าไวโอเลต ความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 2 ถึง 10 เปอร์เซ็นต์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 2 ถึง 10 มิลลิโมลต่อลิตร ต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ของ *Rhodotorula glutinis* CCY 20-2-26 ในอาหารที่มีกลูโคส 30 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 4 กรัมต่อลิตร โมโนโพแทสเซียมฟอตเฟต 4 กรัมต่อลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟต 4 กรัมต่อลิตร พบว่าการเลี้ยงในอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 5 มิลลิโมลต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 80 ชั่วโมง สามารถผลิต ไลโคปีน บีต้า-แคโรทีน และเออโกสเตอรอล เท่ากับ 614.16±127.16 2924.29±369.56 ไมโครกรัมต่อกรัม และ 3.70±0.15 มิลลิกรัมต่อกรัม ปริมาณเซลล์น้ำหนักแห้ง เท่ากับ10.31±1.27 กรัมต่อลิตร และเมื่อนำมาขยายการผลิตเบื้องต้นในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการขนาด 2 ลิตร แบบกึ่งกะ (Fed-batch fermentation) อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส อัตราการปั่นกวน 150 ถึง 200 รอบต่อนาที เติมอากาศ 6 ลิตรต่อนาที พบว่ามีปริมาณเซลล์น้ำหนักแห้ง ประมาณ 40 ถึง 50 กรัมต่อลิตร ที่อุดมด้วยบีต้า-แคโรทีน และไลโคปีน 20 ถึง 40 มิลลิกรัมต่อลิตร (ประมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด 30 ถึง 50 มิลลิกรัมต่อลิตร) และเออโกสเตอรอล ประมาณ 70 มิลลิกรัมต่อลิตร

การผลิตแคโรทีนอยด์โดย *R. mucilaginosa* และการใช้ของเสียทางการเกษตรและโรงงานอุตสาหกรรมในการผลิตแคโรทีนอยด์

Zumriye Aksu and A Tugba Eren (2005) ศึกษาการใช้กากน้ำตาล เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับ *R. mucilaginosa* ในการผลิตแคโรทีนอยด์ ได้ผลผลิตแคโรทีนอยด์ทั้งหมด เท่ากับ 89 มิลลิกรัมต่อลิตร และได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 4 กรัมต่อลิตร และศึกษาการใช้หางนมที่มีแลคโตสในการเลี้ยงยีสต์ *R. mucilaginosa* โดยมีการปรับองค์ประกอบสารอาหารเพิ่มเพื่อให้ใกล้เคียงกับอาหารสังเคราะห์โดยการเติม สารสกัดจากยีสต์ สารสกัดจากมอลต์ แอมเนียมซัลเฟต โมโนโพแทสเซียมฟอสเฟต และแมกนีเซียมซัลเฟส ได้ผลผลิตแคโรทีนอยด์ทั้งหมด เท่ากับ 35 มิลลิกรัมต่อลิตร และได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 2 กรัมต่อลิตร จากการเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 7 และเติมอากาศ 2.4 vvm (Volume per Volume) per Minute

Tinoi, Rakariyatham and Deming (2005) ใช้น้ำทิ้งแป้งถั่วเขียวจากโรงงานผลิตวุ้นเส้นเป็นแหล่งไนโตรเจน และสารสกัดจากมันเทศเป็นแหล่งคาร์บอน สำหรับเลี้ยง *R. glutinis* ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ได้ผลผลิต คือ แคโรทีนอยด์ทั้งหมดเท่ากับ 3.48 มิลลิกรัมต่อลิตร และเซลล์น้ำหนักแห้ง เท่ากับ 10.35 กรัมต่อลิตร จากการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 5.91 อัตราการปั่นกวน 258 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

Cheng and Yang (2016) ศึกษาการผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์ *R. mucilaginosa* โดยใช้ กากน้ำตาล ของเสียจากโรงงานซอสมะเขือเทศ และของเสียจากโรงงานเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ ผลวิพบว่า การเจริญเติบโตของเซลล์และการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์โดยใช้กากน้ำตาลสูงกว่าการเลี้ยงในอาหาร YM (ชุดควบคุม) องค์ประกอบของแคโรทีนอยด์ คือ บีต้า–แคโรทีน 23.8 เปอร์เซ็นต์ โทรูอีน 67.5 เปอร์เซ็นต์ และ โทรูลาโรดิน 8.7 เปอร์เซ็นต์ กากน้ำตาลมีศักยภาพในการผลิตแคโรทีนอยด์ในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากต้นทุนต่ำและมีความสามารถในการผลิตแคโรทีนอยด์ตามธรรมชาติได้

Andrade et al. (2016) สามารถคัดแยกยีสต์ *R. glutinis* UCP155 ได้จากถังบำบัดของเสียไบโอดีเซล และนำมาศึกษาการผลิตแคโรทีนอยด์ด้วย กลีเซอรีนจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล และcorn steep liquor ของเสียจากอุตสาหกรรมข้าวโพดในประเทศบราซิล พบว่า ในอาหารที่มี กลีเซอรีนความเข้มข้น 6% และ corn steep liquor ความเข้มข้น 0.6% ให้ผลผลิตแคโรทีนอยด์ทั้งหมดสูงที่สุด เท่ากับ 160 ไมโครกรัมต่อกรัมยีสต์แห้ง จากการเลี้ยงในสภาวะอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 120 rpm เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

Lau et al. (2018) ศึกษาการใช้ sago starch hydrolysate (SSH) ของเสียจากการหมักเส้นใยสาคูในการผลิตแคโรทีนอยด์จากยีสต์ *R. mucilaginosa* โดยการหมักแบบกะโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ คือ SSH 3.7% และ สารสกัดจากยีสต์ 5 กรัมต่อลิตรในถังปฏิกรณ์ชีวภาพโดยใช้อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส พีเอช 6.5 ความเร็วรอบในการปั่นกวน 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน พบว่าในเวลา 96 ชั่วโมง ได้ปริมาณแคโรทีนอยด์สูงที่สุด เท่ากับ 845.89 ไมโครกรัมต่อกรัมยีสต์แห้ง

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการ

งานวิจัยนี้ศึกษาการผลิตแคโรทีนอยด์จากยีสต์ *Rhodotorula mucilaginosa* UP 12 โดยใช้น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตปลาส้มด้วยการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่ใช้ในการเจริญเติบโตและผลิตแคโรทีนอยด์โดยมีแนวทางดำเนินการดังนี้

อุปกรณ์และสารเคมี

1. อุปกรณ์

1.1 เครื่องแก้วสำหรับการทดลอง

1.2 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Petri dish) ขนาด 60x15 มิลลิเมตร

1.3 หลอดทดลอง (Tube test) ขนาด 16x150 มิลลิเมตร

1.4 คิวเวท (Cuvette) ขนาด 3.5 มิลลิลิตร

1.5 เครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า

1.6 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (ยี่ห้อ Memmert WNB 29)

1.7 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (ยี่ห้อ Biomate3 single cell รุ่น 2K4L365001)

1.8 เครื่องวัดระดับพีเอช (ยี่ห้อ LT LUTRON รุ่น pH-230SD)

1.9 เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (ยี่ห้อ Intettich รุ่น Universal 320)

1.10 ถังหมัก ขนาด 5 ลิตร (ยี่ห้อ winpact Fermenter รุ่น FS-V-A Series)

1.11 ตู้อบลมร้อน (ยี่ห้อ Memmert รุ่น Model WNB Basia)

1.12 เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 2 ตำแหน่ง (ยี่ห้อ OHAUS รุ่น PA4102)

1.13 เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง (ยี่ห้อ OHAUS รุ่น PA214)

1.14 ตู้ดูดควัน (ยี่ห้อ Gtech รุ่น GT240TA)

1.15 เครื่องเขย่าสาร

1.16 เม็ดแก้ว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตร

1.17 กล้องจุลทรรศน์

2. อาหารสำหรับเลี้ยงยีสต์ *Rhodotorula mucilaginosa* UP12

2.1 Yeast malt medium (Himedia)

2.2 Peptone (Himedia)

2.3 Ammonium sulphate (Qrec)

2.4 Sucrose (มิตรผล)

3.สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

3.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณซีโอดี

3.1.1 โพแทสเซียมไดโครเมต (Potassium dichromate ยี่ห้อ Univar)

3.1.2 กรดซัลฟิวริค (Sulfuric acid ยี่ห้อ Merck)

3.1.3 ซิลเวอร์ซัลเฟต (Silver sulphate ยี่ห้อ RCI Labscan)

3.1.4 เมอร์คิวรีซัลเฟต (Mercury sulphate ยี่ห้อ Loba chemie)

3.1.5 เฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต (Ferrous ammonium sulphate, FAS ยี่ห้อ Univar)

3.1.6 เฟอโรอีนอินดิเคเตอร์ (Ferroin indicator ยี่ห้อ Sigma aldrich)

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์คาร์โบไฮเดรตทั้งหมด

3.2.1 สารละลายฟีนอล (Phenol ยี่ห้อ Loba chemiel)

3.2.2 กรดไฮโดรคลอริค (Hydrochloric acid ยี่ห้อ Merck)

3.2.3 โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate ยี่ห้อ Qrec)

3.2.4 กรดซัลฟิวริค (Sulfuric acid ยี่ห้อ Merck)

3.3 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์

3.3.1 ไดเม็ทธิลซัลโฟไซด์ (dimethyl sulfoxide ยี่ห้อ Merck)

3.3.2 ปิโตรเลียม อีเทอร์ (Petroleum ether ยี่ห้อ Qrec)

3.3.3 อะซีโตน (Acetone ยี่ห้อ RCI Labscan)

3.3.3 โซเดียมคลอไรด์ (Sodium Chloride ยี่ห้อ Merck)

3.4 สารเคมีสำหรับปรับความเป็นกรด–ด่าง

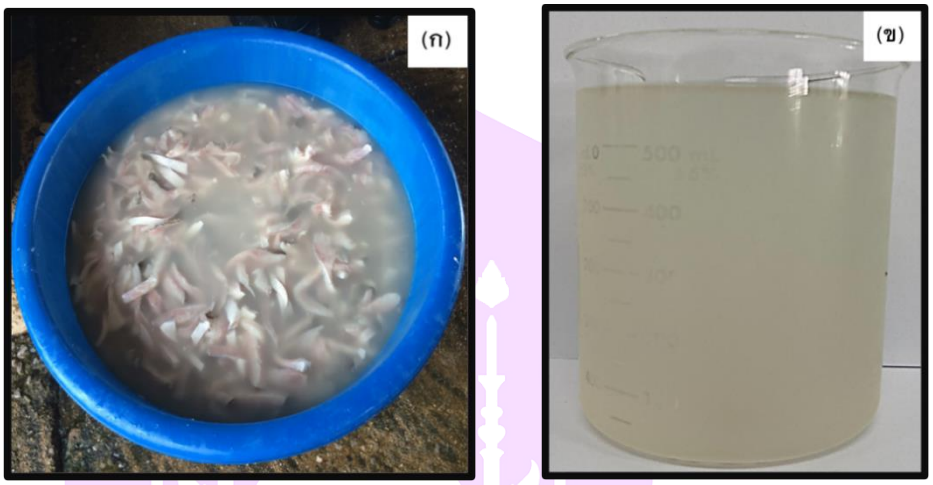
3.4.1 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide ยี่ห้อ Merck)

3.4.2 กรดไฮโดรคลอริค (Hydrochloric acid ยี่ห้อ Merck)

วิธีการทดลอง

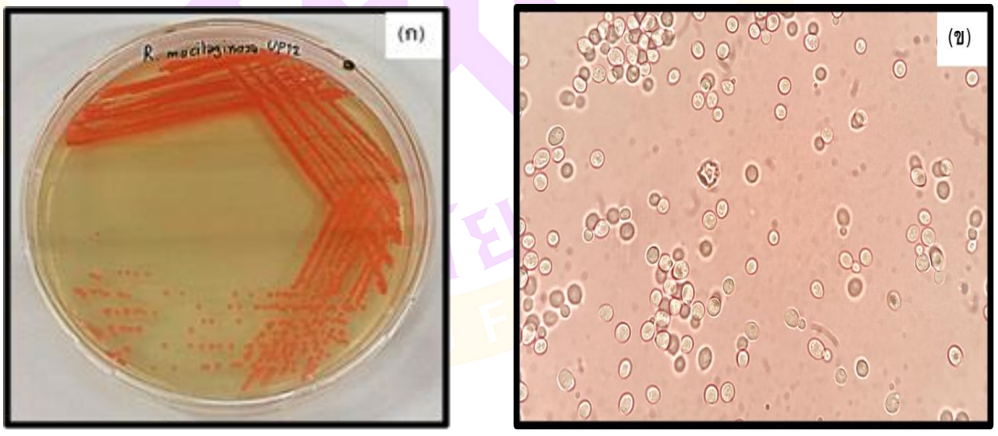
1. ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

1.1 น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตปลาส้มสมศักดิ์นงเยาว์ บ้านสันเวียงใหม่ อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา



ภาพ 8 การเก็บตัวอย่างน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตปลาส้มสมศักดิ์นงเยาว์ บ้านสันเวียงใหม่ ขั้นตอนการล้างปลาในกระบวนการผลิตปลาส้ม(ก) ลักษณะของน้ำทิ้งที่รวบรวมนำมาใช้ในการทดลอง (ข)

1.2 เชื้อที่ใช้ทดสอบ



ภาพ 9 ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 บนจานอาหาร yeast malt agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 96 ชั่วโมง (ก) ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 100x (ข)

การทดลองที่ 1 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำทิ้งโรงงานผลิตปลาส้ม

นำน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตปลาส้มโดยรวบรวมน้ำจากขั้นตอนการล้างปลา มาวิเคราะห์สมบัติทางเคมี ได้แก่ วิเคราะห์ปริมาณออกซิเจนที่สารเคมีใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ (Chemical Oxygen demand, COD) ด้วยวิธี Open reflux method (American Public Health et al., 2005) วิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด ด้วยวิธี ฟีนอล ซัลฟิวริค (Phenol sulfuric) (Dubois et al., 1956) และการวัดความเป็นกรด-ด่าง ด้วย pH meter

การทดลองที่ 2 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์

นำน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตปลาส้มมาเป็นเป็นองค์ประกอบของอาหารสำหรับเลี้ยงยีสต์ *Rhodotorula mucilaginosa* UP12 โดยนำมาศึกษาองค์ประกอบของอาหารโดยเติมแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหาร ความเร็วรอบในการเพาะเลี้ยง ผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ และการขยายผลการผลิตแคโรที่นอยด์ในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ โดยมีวิธีการทดลองดังนี้

2.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

นำน้ำล้างปลาจากโรงงานปลาส้มมาต้มให้เดือด จากนั้นนำมากรองตะกอนออกด้วยผ้าขาวบาง นำส่วนของเหลวที่กรองได้มาเป็นอาหารสำหรับเลี้ยงยีสต์ (สูตรอาหาร C1) และเป็นส่วนประกอบของสูตรอาหาร C1, C2, C3, C4, C5 และ C6 โดยเติมน้ำตาลซูโครส (1% โดยมวลต่อปริมาตร) และแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 0.2 และ 0.5 % โดยมวลต่อปริมาตร สูตรที่ 1 น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตปลาส้ม โดยมีองค์ประกอบของสูตรอาหารทั้งหมดดังแสดงในตาราง 3

ตาราง 3 ส่วนประกอบของสูตรอาหาร YM C1 C2 C3 C4 C5 และ C6 สำหรับเลี้ยง *R. mucilaginosa* UP12

สารละลายหลัก		แหล่งคาร์บอน (% โดยมวลต่อปริมาตร)		แหล่งไนโตรเจน (% โดยมวลต่อปริมาตร)			
สูตรอาหาร		กลูโคส	ซูโครส	Ammonium sulphate	Yeast extract	Malt extract	Peptone
YM	น้ำกลั่น	1	–	–	0.3	0.3	0.5
C1		–	–	–	–	–	–
C2	น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตปลาส้ม	–	1	–	–	–	–
C3		–	–	0.2	–	–	–
C4		–	–	0.5	–	–	–
C5		–	1	0.2	–	–	–
C6			1	0.5	–	–	–

2.2 การเตรียมหัวเชื้อ *R. mucilaginosa* UP12

นำยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 จาก stock culture มาเพาะเลี้ยงบนจานอาหารแข็ง YM บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เขี่ยโคโลนีเดี่ยวบนจานอาหาร ใส่ลงในอาหารเหลว YM ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำยีสต์ที่เลี้ยงได้มาขยายลงในอาหารเหลว YM ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยกำหนดหัวเชื้อเริ่มต้นจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.15–0.17 นาโนเมตร ซึ่งเปรียบเทียบกับจำนวนเซลล์เริ่มต้น เท่ากับ $2x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

2.3 การหาน้ำหนักแห้ง และปริมาณแคโรทีนอยด์ (กิตติชัย ตันสิน, 2553)

นำเชื้อที่เลี้ยงได้จากการเลี้ยงในอาหารสูตร C1 C2 C3 C4 C5 C6 และ YM ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสไว้ใช้สำหรับการวิเคราะห์คาร์โบไฮเดรตทั้งหมด และล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น ส่วนที่ต้องการหาน้ำหนักแห้งนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสให้ได้น้ำหนังเซลล์ที่คงที่ จากนั้นนำไปชั่งน้ำหนักด้วย

เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง ส่วนที่ต้องการสกัด นำมาเติม DMSO 2 มิลลิลิตร และ glass bead 3 เม็ดนำไป vortex เพื่อทำให้เซลล์แตก จากนั้นเติม ปีโตรเลียม อีเทอร์: โซเดียม คลอไรด์: อะซิโตน ตามลำดับ ในอัตราส่วน 1:1:1 เขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายสีส้มใสด้านบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 474 นาโนเมตร โดยมีค่า Extinction coefficient เท่ากับ 2100

คำนวณปริมาณแคโรทีนอยด์ดังสมการ

$$\text{แคโรทีนอยด์ (ไมโครกรัมต่อกรัมยีสต์แห้ง)} = \frac{(\text{ปริมาณปีโตเลียมอีเทอร์มล.})\ (A474 \times 100)}{(21)\ (\text{น้ำหนักแห้ง})}$$

2.4 การศึกษาการสร้างแคโรทีนอยด์จากยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 ในสภาวะการเลี้ยงต่าง ๆ

การเลี้ยงยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 ในอาหารที่ใช้น้ำทิ้งจากโรงงานผลิตปลาส้มเป็นองค์ประกอบ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม คือ อาหารเหลว YM โดยการเติมหัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นบ่มที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที และวัดประสิทธิภาพของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ น้ำหนักเซลล์แห้ง และคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดในอาหาร ในวันที่ 5 7 และ 9

2.4.1 การศึกษาความเป็นกรด–ด่างในอาหารต่อการผลิตแคโรทีนอยด์

นำอาหารสูตร C1 C2 C3 C4 C5 C6 และYM มาปรับความเป็นกรด–ด่าง จำนวน 3 ระดับ คือ 4 5 และ 6 และนำมาเติมหัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงเชื้อตามสภาวะที่กำหนด เป็นเวลา 9 วัน วิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ ปริมาณเซลล์น้ำหนักแห้ง และคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดในอาหาร ในวันที่ 5 7 และ 9

2.4.2 การศึกษาอัตราความเร็วรอบในการเขย่าต่อการผลิตแคทีนอยด์

ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสูตรอาหารและระดับพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ในข้อ 2.4.1 ที่แสดงผลการผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงสุด จึงมาทดสอบผลของความเร็วรอบในการเขย่าต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ด้วยอัตราความเร็วรอบเขย่า 100 150 และ 200 รอบต่อนาที โดยเปรียบเทียบกับอาหารเหลว YM และอาหารสูตร C1 เป็นชุดควบคุม บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน วิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ น้ำหนักเซลล์แห้ง และคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดในอาหาร ในวันที่ 5 และ 7

2.4.3 การศึกษาผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อการผลิตแคโรทีนอยด์

นำสูตรอาหารและสภาวะที่เหมาะสมจากการทดลอง 2.4.2 มาทดสอบผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อการผลิตแคทีนอยด์ ที่ความเข้มข้น 0 5 และ 10 เปอร์เซ็น โดยเปรียบเทียบกับอาหารเหลว YM เป็นชุดควบคุม บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน วิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์และเซลล์น้ำหนักแห้งในวันที่ 5 และ 7

2.4.4 การศึกษาการผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 ในถังหมักในระดับห้องปฏิบัติการ

ขยายการผลิตแคโรทีนอยด์ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ยี่ห้อ Winpact Fermenter รุ่น FS-V-A Series โดยเลือกสูตรอาหาร และสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในหัวข้อ 2.4.2 มาทำการทดสอบโดยการเติม และไม่เติมสารสกัดยีสต์ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 1.5 ลิตร เติมหัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็น ด้วยอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 7 วัน วัดอัตราการเจริญของยีสต์ ปริมาณแคโรทีนอยด์ น้ำหนักเซลล์แห้ง และคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดในอาหาร ในวันที่ 5 และ 7

การวัดอัตราการเจริญยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 ระหว่างการเลี้ยงด้วยถังหมักในระดับห้องปฏิบัติการ

วัดการเจริญเติบโตของยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 โดยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ทำการวัดที่ 0 24 48 72 96 และ 120 ชั่วโมง

2.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำผลการทดลองมาวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (Analysis of Variance : ANOVA) โดยใช้แผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มการทดลอง โดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT)

บทที่ 4

ผลและอภิปรายผลการวิจัย

การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 โดยใช้น้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมผลิตปลาส้ม โดยปัจจัยที่นำมาศึกษา ประกอบด้วย องค์ประกอบทางเคมีของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ความเป็นกรด–ด่าง ความเร็วรอบในการเขย่า ความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ รวมถึงศึกษาการขยายผลการผลิตแคโรทีนอยด์ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้สูตรอาหารที่สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงที่สุดจากการศึกษาเบื้องต้น นำมาเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์จากปริมาณแคโรทีนอยด์ น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีผลการศึกษา ดังนี้

1. องค์ประกอบทางเคมีของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำล้างปลาจากโรงงานปลาส้มเป็นองค์ประกอบ

การศึกษาครั้งนี้ใช้น้ำทิ้งจากกระบวนการล้างปลาเพื่อเป็นองค์ประกอบหลักในอาหารเลี้ยงยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 เมื่อวิเคราะห์ซีโอดีพบว่ามีปริมาณซีโอดี เท่ากับ 4.27±0.64 กรัมต่อลิตร และปริมาณคาร์โบไฮเดรต เท่ากับ 3.35±0.02 กรัมต่อลิตร ปรับสูตรอาหารโดยเติมแหล่งคาร์บอนด้วยน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร (C2 C5 และ C6) และเติมแหล่งไนโตรเจนจากแอมโมเนียมซัลเฟต ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร (C3 และ C5) และ 5 กรัมต่อลิตร (C4 และ C6) (ดังแสดงในตารางที่ 3) เมื่อนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในอาหาร วัดจากค่าซีโอดี และคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด จากผลการวิเคราะห์ ดังแสดงในตารางที่ 4 พบว่าปริมาณสารอินทรีย์ที่เปรียบเทียบจากค่าซีโอดีในสูตรอาหาร YM มีปริมาณสูงสุด เท่ากับ 10.47 ±0.61 กรัมต่อลิตร รองลงมา คือ สูตร C6 มีปริมาณซีโอดีเท่ากับ 9.47 ±0.30โดยอาหารสูตร C1 เป็นน้ำล้างปลาผ่านการต้ม และกรองตะกอนยังคงมีสารอินทรีย์ที่สามารถเป็นสารอาหารสำหรับจุลินทรีย์ได้

ตาราง 4 ค่าซีโอดีและปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ

สูตรอาหาร	ซีโอดี (COD) (กรัมต่อลิตร)	คาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (TCD) (กรัมต่อลิตร)
C1	4.27^{d} ±0.64	3.35^{b} ±0.02
C2	8.60^{c} ±0.40	7.25^{a} ±0.01
C3	4.73^{d} ±0.50	3.47^{b} ±0.01
C4	4.27^{d} ±0.80	3.47^{b} ±0.04
C5	8.33^{c} ±0.46	7.15^{a} ±0.02
C6	9.47^{ab} ±0.30	7.29^{a} ±0.03
YM	10.47^{a} ±0.61	7.45^{a} ±0.03

หมายเหตุ : อักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

เมื่อเปรียบเทียบสูตรอาหารต่าง ๆ แสดงให้เห็นว่าการเติมแหล่งคาร์บอนจากน้ำตาลซูโครสส่งผลให้ค่าซีโอดีสูงขึ้นอย่างชัดเจนจากการตรวจพบในอาหารทั้งสามสูตร คือ อาหารสูตร C2, C5 และ C6 ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่สูงกว่าอาหารสูตรอื่น ๆ เช่นกัน

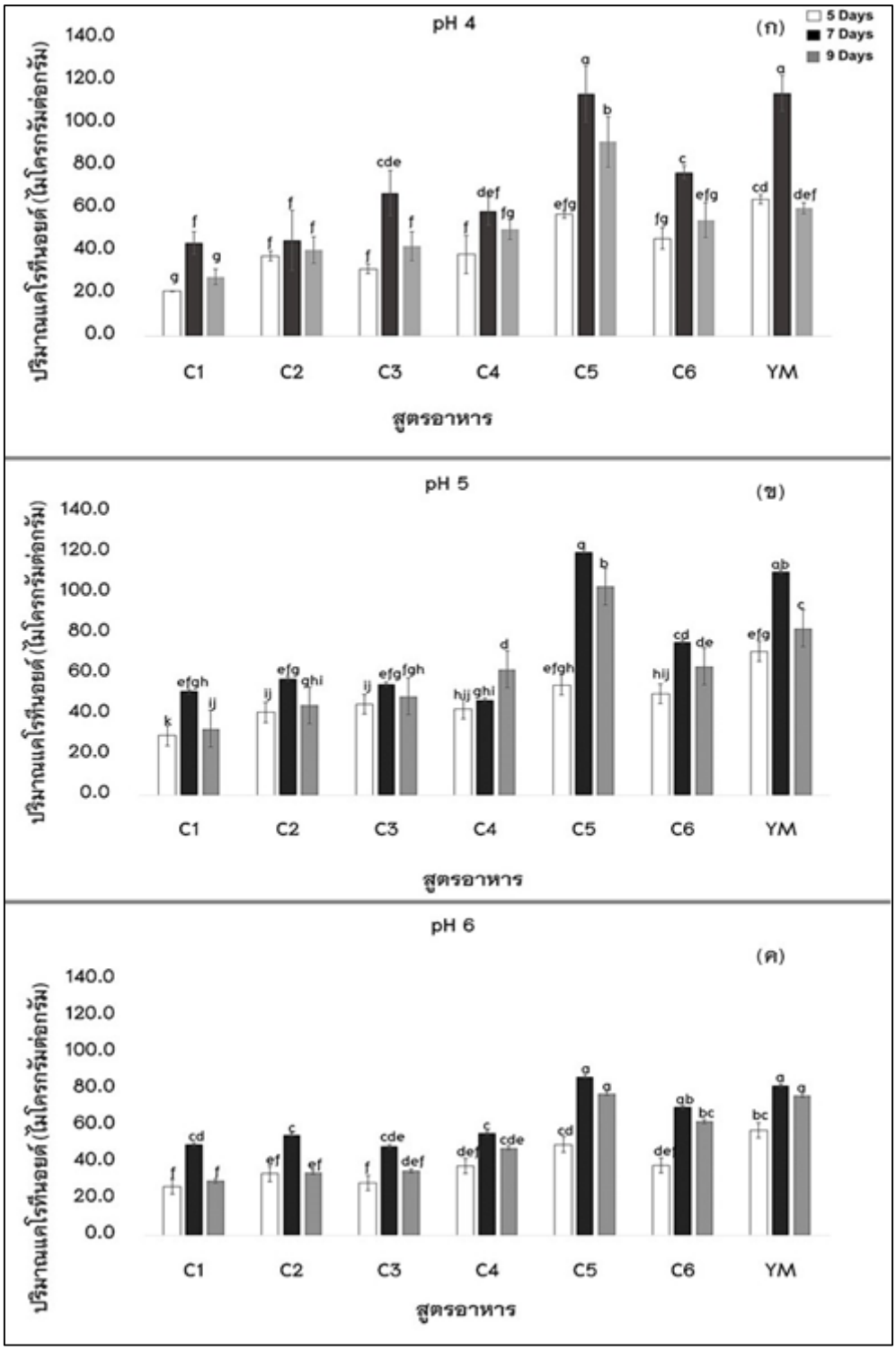
2. สูตรอาหาร และความเป็นกรด-ด่าง ที่มีผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์

จากการศึกษาผลของอาหารเลี้ยงเชื้อ C1 C2 C3 C4 C5 และ C6 โดยใช้อาหารสำหรับเลี้ยงยีสต์ YM เป็นชุดควบคุม และปรับพีเอช ของอาหาร เท่ากับ 4 5 และ 6 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 9 วัน โดยวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ ปริมาณเซลล์น้ำหนักแห้ง และปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด ในวันที่ 5 7 และ 9 เมื่อเปรียบเทียบปริมาณแคโรทีนอยด์ที่สกัดได้จากเซลล์ *R. mucilaginosa* UP12 จากการเพาะเลี้ยงด้วยสูตรอาหารทั้งหมด ดังแสดงใน ภาพที่ 10 พบว่า การผลิตแคโรทีนอยด์ในเซลล์จะเพิ่มขึ้นในช่วง 5 ถึง 7 วัน โดยพบปริมาณการแคโรทีนอยด์สูงสุดหลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน และมีแนวโน้มลดลงอย่างชัดเจนในวันที่ 9 นอกจากนี้การเลี้ยงในอาหารที่มีพีเอช 6 พบปริมาณแคโรทีนอยด์ในเซลล์ต่ำกว่าที่พีเอช 4 และ 5 (ดังแสดงในภาพที่ 10 (ก) (ข) และ (ค))

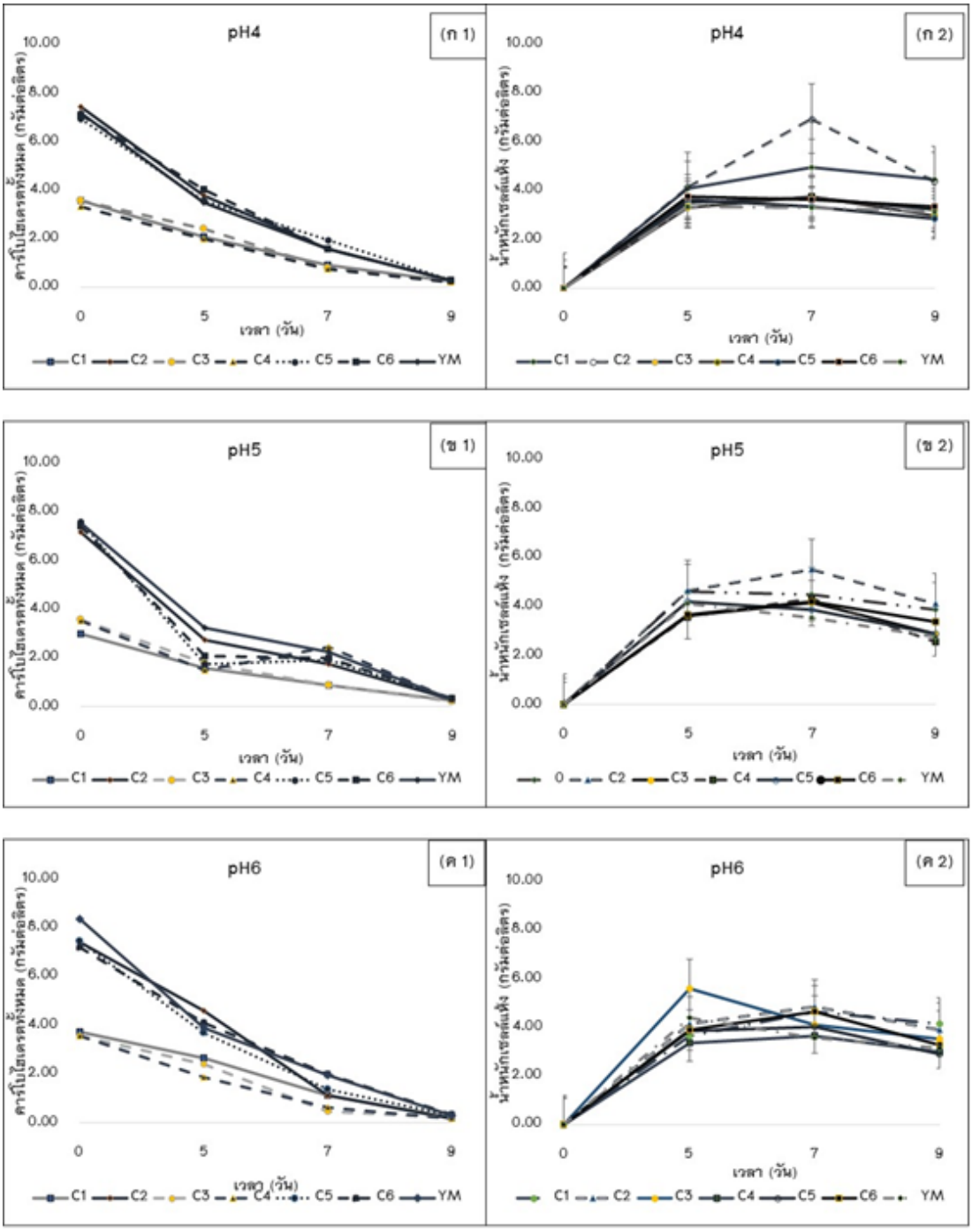
ปริมาณแคโรทีนอยด์ในเซลล์ที่สกัดได้จากการเลี้ยงในอาหาร YM มีปริมาณใกล้เคียงกับอาหารสูตร C5 ในขณะที่ปริมาณแคโรทีนอยด์ในเซลล์ยีสต์เลี้ยงในอาหารกลุ่ม C1 C2 C3 และ C4 มีปริมาณใกล้เคียงกัน แสดงให้เห็นว่าการเติมแหล่งคาร์บอนหรือไนโตรเจนอย่างเดียวไม่เพียงพอที่จะส่งเสริมให้เซลล์ผลิตแคโรทีนอยด์สูงขึ้น ดังเช่นที่พบในเซลล์ที่เจริญในอาหารสูตร C2 C3 และ C4 และจากการทดลองนี้เมื่อเปรียบเทียบในสูตรอาหาร C5 และ C6 ซึ่งมีการเติมแหล่งคาร์บอนในปริมาณที่เท่ากัน (ซูโครส 10 กรัมต่อลิตร) แต่แตกต่างที่ปริมาณการเติมไนโตรเจน พบว่า ในอาหารสูตร C6 เติมแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร มีการสร้างแคโรทีนอยด์ในเซลล์ได้น้อยกว่าที่พบในอาหารสูตร C5 ที่เติมแอมโนเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร น้ำทิ้งจากขั้นตอนการล้างปลาในอุตสาหกรรมการผลิตปลาส้มสามารถนำมาเลี้ยงยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 และผลิตสารแคโรทีนอยด์ได้เช่นเดียวกับรายงานการเลี้ยงยีสต์ *R. mucilaginosa* จากน้ำทิ้งแหล่งอุตสาหกรรมการแปรรูปอาหารอื่น ๆ การเลี้ยงยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 เพื่อผลิตแคโรทีนอยด์ในครั้งนี้ พบว่า อาหารสูตรที่เหมาะสมที่สุด คือ C5 ประกอบด้วยน้ำล้างปลาเติมน้ำตาลซูโครส 1 เปอร์เซนต์ และแอมโมเนียมซัลเฟต 0.2 เปอร์เซนต์โดยมวลต่อปริมาตร ปรับพีเอช 5 และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าความเร็วรอบ 100 rpm ระยะเวลาการเลี้ยง 7 วัน สามารถผลิต แคโรทีนอยด์ได้สูงที่สุด เท่ากับ 120.20±15.25 ไมโครกรัมต่อกรัมยีสต์แห้ง และปริมาณผลผลิตทั้งหมด เท่ากับ 0.47±0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร รองลงมาคือ การเลี้ยงอาหาร YM ด้วยสภาวะเดียวกัน พบปริมาณแคโรทีนอยด์ภายในเซลล์ เท่ากับ 110.37±6.14 ไมโครกรัมต่อกรัมยีสต์แห้ง และมีปริมาณผลผลิตทั้งหมดเท่ากับ 0.39±0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียกกับการเลี้ยงด้วยอาหาร C1 ที่เป็นอาหารสูตรเริ่มต้นในสภาวะเดียวกันพบว่า มีปริมาณแคโรที

นอยด์ภายในเซลล์ เท่ากับ 51.16±2.37 ไมโครกรัมต่อกรัมยีสต์แห้ง และมีปริมาณผลผลิตทั้งหมด เท่ากับ 0.23 ±0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร การเลี้ยงในอาหารสูตร C5 มีประสิทธิภาพในการผลิตแคโรทีนอยด์สูงกว่า อาหาร YM และ C1 1 เท่า และ 2.3 เท่า ตามลำดับ

การเจริญของ *R. mucilaginosa* UP12 ในอาหารสูตรต่าง ๆ ที่ค่าพีเอช 4 5 และ 6 โดยเทียบจากปริมาณน้ำหนักแห้งและปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดที่คงเหลือในอาหารสูตรต่าง ๆ (ดังแสดงใน ภาพที่ 11 ก ข และ 12) พบว่า น้ำหนักแห้งเซลล์มีปริมาณเพิ่มขึ้นในช่วงวันที่ 0 – 5 และค่อนข้างคงที่ในวันที่ 7 โดยมีแนวโน้มที่ลดลงในวันที 9 (ดังแสดงในภาพที่ 11 (ก 2) (ข 2) และ(ค 2)) ซึ่งมีความสอดคล้องกับปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ลดลงและหมดลงในช่วงวันที่ 9 เช่นกัน (ดังแสดงในภาพที่ 11 (ก 1) (ข 1) และ (ค 1)) โดยปริมาณเซลล์แห้งสูงสุดพบในอาหารสูตร C2 ที่ระยะเวลา 7 วัน ระดับพีเอช 4 และ 5 เท่ากับ 6.95±0.18 และ 5.52±0.50 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับปริมาณที่พบในอาหารสูตร C3 ที่ระดับ พีเอช 6 ในวันที่ 5 มีปริมาณเซลล์แห้งเท่ากับ 5.59±0.20 กรัมต่อลิตร (ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ) ในขณะที่อาหารสูตร C1 และ C5 ที่ระดับพีเอช 5 ในวันที่ 5 พบปริมาณเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 4.62±0.52 และ 4.20±0.20 กรัมต่อลิตร อาหารสูตร C4 พบปริมาณเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 4.34±0.20 กรัมต่อลิตร ที่ระดับพีเอช 5 ในวันที่ 7



ภาพ 10 ปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ได้จากยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 ที่เลี้ยงในอาหารสูตรต่าง ๆ ที่ปรับพีเอช เท่ากับ 4 (ก) 5 (ข) 6 (ค)



ภาพ 11 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดในอาหารสูตร C1 C2 C3 C4 C5 C6 และ YM ที่ปรับพีเอช เท่ากับ 4 (ก 1) 5 (ข 1) และ 6 (ค 1) ระหว่างการเลี้ยงเพื่อผลิตแคโรทีนอยด์ และน้ำหนักเซลล์แห้งในอาหารสูตร C1 C2 C3 C4 C5 C6 และ YM ที่ปรับพีเอช เท่ากับ เท่ากับ 4 (ก 2) 5 (ข 2) และ 6 (ค 2)

จากรายงานวิจัยส่วนใหญ่การเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณการผลิตแคโรทีนอยด์จำเป็นต้องเติมแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน หรือแร่ธาตุอื่นๆ เพิ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังเช่น การศึกษาของ Elsanhoty, Al-Turki and M.M (2017) เกี่ยวกับชนิดของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนมีผลต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ในยีสต์ *R. mucilaginosa* ที่แยกจากบริเวณผิวของพืชผัก พบว่า น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ยีสต์ชนิดนี้สามารถใช้ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ ซูโครส และเด็กซ์ทริน ตามลำดับ และแหล่งไนโตรเจนเหมาะสมเรียงตามลำดับ คือ เปปโตน แอมโมเนียมซัลเฟต และยูเรีย

สำหรับการเลี้ยงยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 เมื่อเปรียบเทียบผลการใช้แหล่งคาร์บอนในปริมาณความเข้มข้นที่เท่ากัน แสดงให้เห็นว่าการใช้ซูโครสจากอาหารสูตร C5 มีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับการใช้กลูโคสจากอาหาร YM ทั้งในด้านการเพิ่มจำนวนเซลล์และการผลิตแคโรทีนอยด์ อาจเนื่องมาจากในองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงยีสต์ที่ได้จากน้ำล้างชิ้นส่วนของปลานั้นมีปริมาณสารอินทรีย์ประเภทไขมันและโปรตีนที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้อย่างเหมาะสมเช่นเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อ YM อย่างไรก็ตามการสร้างแคโรทีนอยด์ในเซลล์ยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 ยังพบปริมาณน้อยกว่าที่รายงานโดย Zumriye Aksu and A Tugba Eren (2005) ซึ่งศึกษาการเลี้ยง *R. mucilaginosa* NRRL-2502 ด้วยน้ำตาลซูโครสที่ได้จากกากน้ำตาล (molass) ปรับให้มีความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร (2 เปอร์เซ็นต์) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าความเร็วรอบ 100 rpm ระยะเวลาการเลี้ยง 10 วัน ทำให้เซลล์สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงสุดถึง 21.2 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ปริมาณเซลล์แห้งสูงสุดที่ 4.2 กรัมต่อลิตร แสดงให้เห็นว่าแหล่งคาร์บอนที่เพิ่มขึ้นทำให้ *R. mucilaginosa* NRRL-2502 มีการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงขึ้น

อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบการผลิตแคโรทีนอยด์ที่ได้จากการเลี้ยงในอาหาร YM ในช่วงพีเอช 4-5 ระยะเวลา 5 วัน พบว่า *R. mucilaginosa* UP12 มีปริมาณการผลิตแคโรทีนอยด์อยู่ในช่วง 64.28 – 71.06 ไมโครกรัมต่อกรัมยีสต์แห้ง ซึ่งมีปริมาณใกล้เคียงกับ *R. mucilaginosa* -137 เมื่อเลี้ยงในอาหาร YM เขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน พบแคโรทีนอยด์ปริมาณ 64.4 ไมโครกรัมต่อกรัมยีสต์แห้ง (Maldonade, Scamparini and Rodriguez-Amaya, 2007)

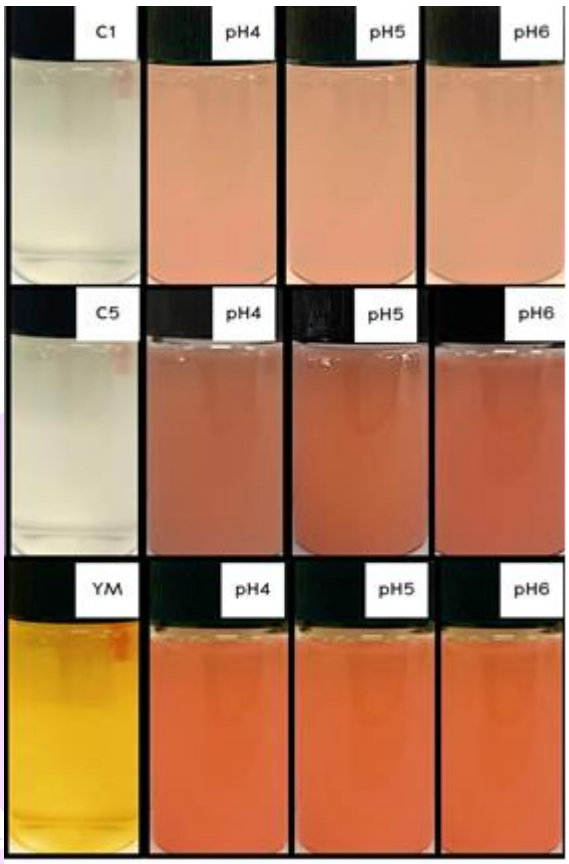
จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่ามีปริมาณแคโรทีนอยด์สูงกว่าเคยมีรายงานของ (สุภาพร ภัสสร, นิตยา สุขวรรณา และพนิตนาฏ อู่พุฒินันท์, 2559) โดยมีปริมาณแคโรทีนอยด์เท่ากับ 14.59±0.55 ไมโครกรัมต่อกรัมยีสต์แห้ง อาจเนื่องมาจากการปรับค่าพีเอชในอาหารเหลว YM ให้มีความเป็นกรดเพิ่มมากขึ้น (ค่าพีเอช 4-5) ทำให้มีความเหมาะสมต่อการเจริญ

และผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 มากขึ้น ถึงแม้ว่ายีสต์สามารถเติบโตได้ในพีเอชช่วงกว้าง แต่อย่างไรก็ตามค่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการผลิตแคโรทีนอยด์ มีความแตกต่างกันขึ้นอยู่ชนิดสายพันธุ์ ดังเช่น ในอาหารที่ปรับพีเอช 5 เหมาะสมสำหรับการผลิตแคโรทีนอยด์ในยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 สอดคล้องกับการรายงาน Cheng and Yang (2016) การทดลองเลี้ยง *R. mucilaginosa* F-1 ในอาหาร YM โดยปรับพีเอชในช่วง 4-7 และบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เขย่าความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ระยะเวลาการเลี้ยง 7 วัน พบว่า ในอาหารที่มีพีเอช 5 มีความเหมาะสมต่อการผลิตแคโรทีนอยด์สูงที่สุด เท่ากับ 317.6 ไมโครกรัมต่อกรัมยีสต์แห้ง ซึ่งแตกต่างจากการศึกษายีสต์ *R. mucilaginosa* MTCC11835 สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้ในสูตรอาหารที่ประกอบด้วย กลูโคส:กลีเซอรอล ในอัตราส่วน 1:2 เปปโตน ความเข้มข้น 0.5% และ ทวีน 20 ความเข้มข้น 2.5 mM ที่ค่า พีเอช 6.5 สามารถผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุดเท่ากับ 21.77 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (Dhaliwal MK and Chandra, 2015) ซึ่งผลของพีเอชต่อการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ในยีสต์ *R. mucilaginosa UP12* ยังคงต้องศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้เกิดความเข้าใจมากขึ้น เนื่องจากเกี่ยวข้องกับการเจริญของเซลล์และและการรักษาค่าพีเอชของไซโทพลาสซึมให้คงที่อยู่ได้ (pH homeostasis) โดยอาศัยกิจกรรมของเมแทบอลิซึม ดังเช่นการรายงานผลของพีเอชในอาหารเลี้ยงยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* การเพิ่มขึ้นของพีเอชในช่วง 4 ถึง 9 ทำให้กระบวนการหายใจภายในเซลล์เพิ่มขึ้นตามค่าพีเอชที่สูงขึ้นและจะหยุดการเจริญที่พีเอช 8 (Peña et al., 2015)

ตาราง 5 ปริมาณเซลล์แห้งและปริมาณแคโรทีนอยด์ของ *R. mucilaginosa* UP12 เลี้ยงในอาหาร C1, C5 และ YM ปรับ pH 5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

สูตรอาหาร	pH 5			
	ปริมาณแคโรทีนอยด์ (ไมโครกรัม/กรัม)	ปริมาณเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	ผลผลิตแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/ลิตร)	ผลผลิตแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/ลิตร/วัน)
C1	51.16±2.37^{b}	4.50±0.13^{a}	0.23±0.01^{c}	0.03±0.01^{b}
C5	120.20±15.25^{a}	3.87±0.28^{b}	0.47±0.02^{a}	0.08±0.02^{a}
YM	110.37±6.14^{a}	3.55±0.28^{b}	0.39±0.02^{b}	0.06±0.03^{a}

หมายเหตุ : อักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)



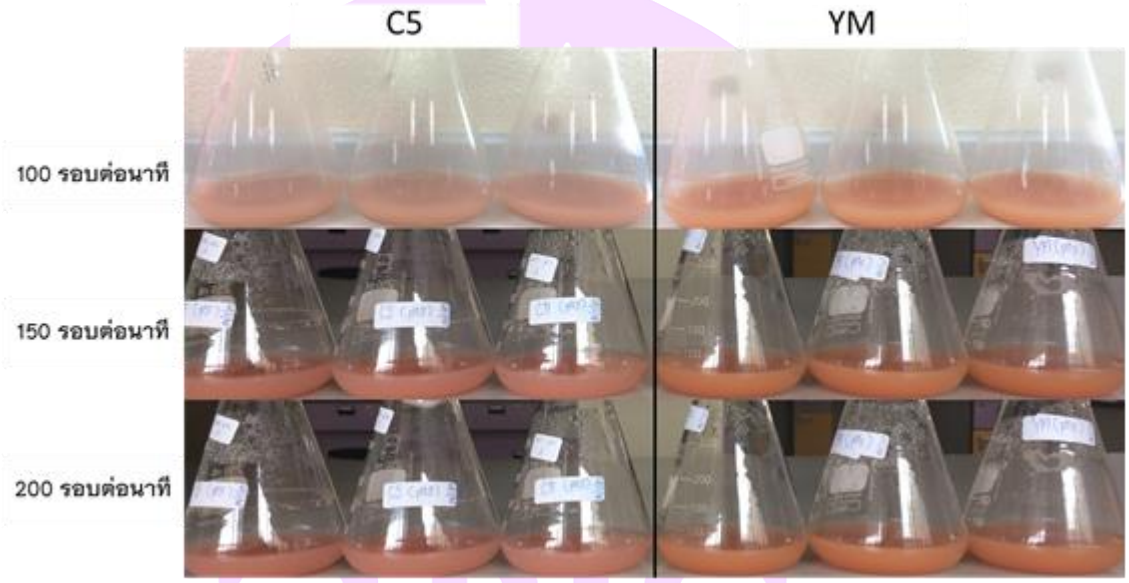
ภาพ 12 ตัวอย่างการเจริญของ *R. mucilaginosa* UP12 ในอาหาร C1 C5 และ YM ที่มีความเป็นกรด–ด่าง เท่ากับ 4 5 และ 6 ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตแคโรทีนอยด์ใน *R. mucilaginosa* UP12 โดยคัดเลือกจากสภาวะที่พบปริมาณการผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุดของอาหาร 3 สูตร คือ C1 C5 และ YM จากการเลี้ยงในวันที่ 7 ที่พีเอชของอาหาร เท่ากับ 5 ดังแสดงใน ตารางที่ 4 พบว่า *R. mucilaginosa* UP12 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร C5 และ YM มีปริมาณแคโรทีนอยด์ในเซลล์ (Carotenoid content) สูงสุดอยู่ในช่วง 104.23 – 135.35 ไมโครกรัมต่อกรัมยีสต์แห้ง และมีปริมาณมากกว่าที่พบจากการเลี้ยงในสูตรอาหาร C1 ประมาณ 2.5 เท่า แต่กลับพบว่าการเลี้ยงในอาหารสูตร C1 มีปริมาณเซลล์แห้งมากกว่าประมาณ 1.2 เท่า เมื่อเทียบประสิทธิภาพการผลิตแคโรทีนอยด์ของทั้งสามชนิด และแสดงให้เห็นว่าการเลี้ยง *R. mucilaginosa* UP12 ในสูตรอาหาร C5 สามารถให้ผลผลิตแคโรทีนอยด์สูงสุด (Carotenoid product) และมากกว่าอาหาร YM อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ประมาณ 1.2 เท่า สอดคล้องกับรายงานของ Meyer

and Du Preez (1994) พบว่า การเจริญของเซลล์ *Phaffai rhodozyma* ในอาหารที่มี อัตราส่วนของคาร์บอนไนโตเจนสูงเกินไป ส่งผลให้เซลล์มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ในขณะเดียวกันปริมาณแอสตร้าแซนทีนในเซลล์มีปริมาณลดลง เนื่องจากเซลล์มีการเจริญอย่างรวดเร็วซึ่งเป็นวิถีเมตาบอริซึมปฐมภูมิ และยับยั้งเอนไซน์ที่ใช้ในการสังเคราะห์บีต้า-แคโรทีน นอกจากนี้อาหารที่มีไนโตเจนสูงอาจช่วยส่งเสริมการเจริญของเซลล์แต่จะยับยั้งเอนไซม์สำหรับเปลี่ยนบีต้า-แคโรทีนเป็นแอสตร้าแซนทีน ซึ่งสอดคล้องกลับ ปริมาณเซลล์น้ำหนักแห้ง ในอาหารสูตร C3 พีเอช 6 ในวันที่ 5 มีปริมาณเซลล์แห้งเท่ากับ 5.59±0.20 กรัมต่อลิตร สูงรองจากในอาหาร C2 ปริมาณแคโรทีนอยด์ในเซลล์จากการเลี้ยงในอาหาร C3 มีปริมาณต่ำกว่า C5 เช่นเดียวกับ C2 เช่นเดียวกับรายงาน (Liu and Wu, 2007) ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตแคโรทีนอยด์ และการเจริญเติบโตของเซลล์ *Xanthophyllomyces dendrorhous* ผ่านการออกแบบการทดลองด้วยสถิติ รายงานถึงความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส และแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมต่อการการเจริญเติบโตของเซลล์ และผลิตแคโรทีนอยด์ พบว่า สำหรับการผลิตเซลล์ใช้น้ำตาลกลูโคส เท่ากับ 33.4 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต เท่ากับ 2.95 กรัมต่อลิตร ระดับพีเอช 5.58 สำหรับการผลิตแคโรทีนอยด์ ใช้น้ำตาลกลูโคส เท่ากับ 19.2 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต เท่ากับ 0.81 กรัมต่อลิตร ระดับพีเอช 5.19 แคโรทีนอยด์ที่เป็นสารทุติยภมิส่วนใหญ่จะถูกสังเคราะห์เมื่อเซลล์อยู่ภายใต้ความเครียด เช่น การจำกัดสารอาหาร ซึ่งจะส่งผลให้กระบวนการสังเคราะห์เซลล์ซึ่งเป็นเมตาบอริซึมหลักจะถูกระงับ เป็นไปได้ว่าเมื่อมีอัตราส่วนคาร์บอน ไนโตรเจนในอาหาร สูงหรือต่ำจนเกินไป ส่งผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ อย่างมากเนื่องจากจะมีผลโดยตรงต่อวิถีเมตาบอลิซึมปฐมภูมิซึ่งอาจยับยั้งบวนการสังเคราะห์สารในวิถีเมตาบอลิซึมทุติยภูมิ จากข้อมูลการเลี้ยงยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 เพื่อผลิตสารแคโรทีนอยด์ในเบื้องต้นนี้ แสดงให้เห็นว่าอาหารสูตรที่มีเพียงน้ำล้างปลาอย่างเดียวยังไม่มีประสิทธิภาพพอในการผลิตแคโรทีนอยด์ การเติมปริมาณคาร์บอนและไนโตรเจนเพิ่มขึ้นส่งเสริมการผลิตเซลล์ยีสต์และสร้างแคโรทีนอยด์ได้สูงขึ้น ดังรายงานของ Chanchay et al. (2012) กล่าวถึงในช่วงการเจริญเพิ่มปริมาณเซลล์มีความต้องการปริมาณคาร์บอนและไนโตรเจนสูงกว่าในช่วงการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์

3. การศึกษาอัตราความเร็วรอบในการเขย่าต่อการผลิตแคทีนอยด์

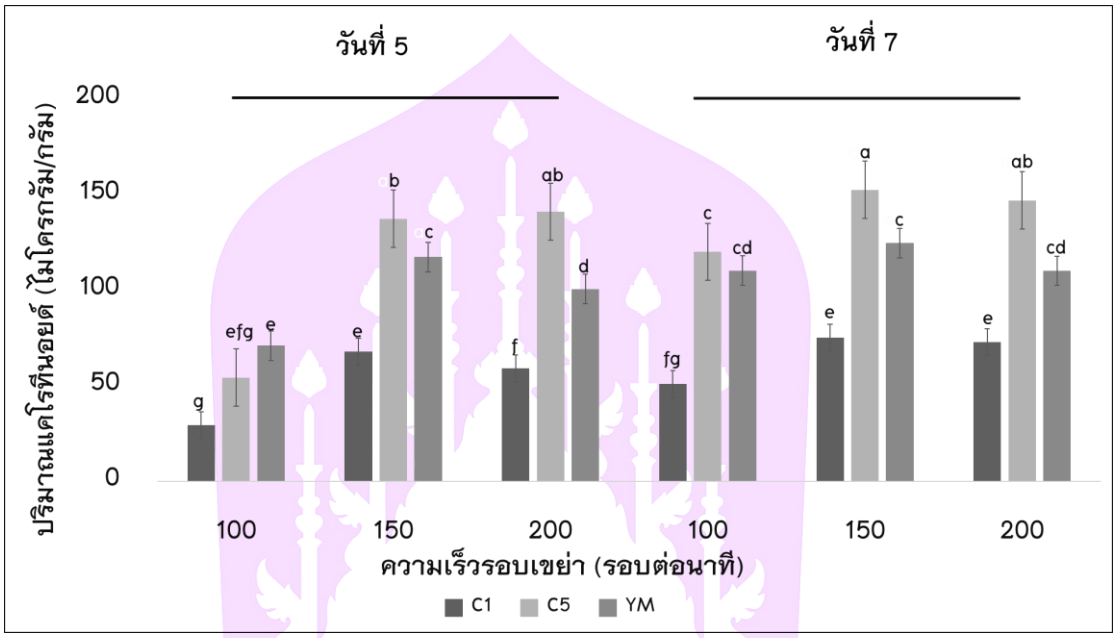
จากการศึกษาผลของความเร็วรอบในการเขย่าต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ โดยใช้อาหารที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงยีสต์ YM และอาหาร C1 เป็นชุดควบคุม และใช้อาหาร C5 ที่มีความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5 ในการทดสอบ และกำหนดความเร็วรอบในการเลี้ยง เท่ากับ 100 150 และ 200 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน วิเคราะห์แคโรทีนอยด์และน้ำหนักเซลล์แห้ง ในวันที่ 5 และ 7 (ดังแสดงในภาพที่ 13)



ภาพ 13 ตัวอย่างการเจริญของยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 ในอาหารC5 และ YM บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ที่ความเร็วรอบ 100 150 และ 200 รอบต่อนาที

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณแคโรทีนอยด์ที่สกัดได้จากเซลล์ *R. mucilaginosa* UP12 ที่เลี้ยงด้วยความเร็วรอบในการเขย่าต่างกัน พบว่า การเลี้ยงในความเร็วรอบ 150 และ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน มีการผลิตแคโรทีนอยด์สูงขึ้นมากกว่าการเลี้ยงด้วยการเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน จากการทดลองก่อนหน้า การเลี้ยงยีสต์ในอาหาร C5 ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ในวันที่ 7สามารถผลิตแคโรทีนอย์ได้ เท่ากับ 152.66±20.29 ไมโครกรัมต่อกรัมยีสต์แห้ง ลำดับต่อมา คือ อาหาร C5 ที่เลี้ยงด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ในวันที่ 7 สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ ได้เท่ากับ 147.11±8.84 ไมโครกรัมต่อกรัมยีสต์แห้ง (ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ) (ดังแสดงในภาพที่ 14) เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณ แคโรทีนอยด์ที่เลี้ยงด้วยความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที จากการทดลองที่ 2 ที่ศึกษาสูตรอาหารและความเป็นกรด-ด่างในอาหารต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ พบว่า การเลี้ยง ยีสต์ใน

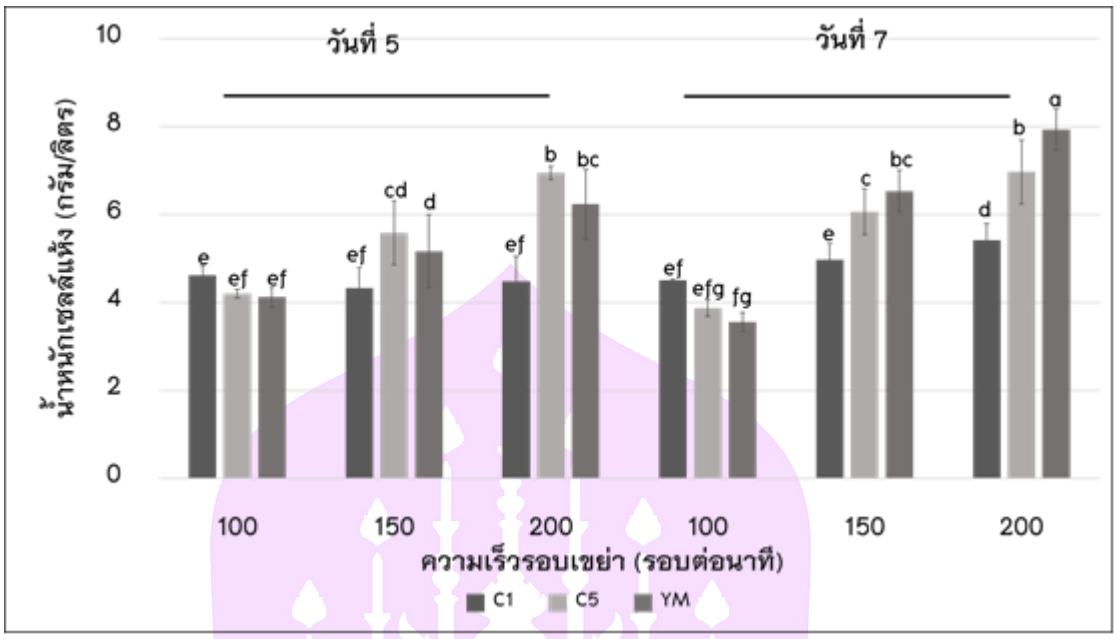
อาหาร C5 ที่มีระดับพีเอช เท่ากับ 5 เป็นเวลา 7 วัน มีปริมาณแคโรทีนอยด์ 120.20±15.25 ไมโครกรัมต่อกรัมยีสต์แห้ง ซึ่งในการทดลองนี้การเลี้ยงยีสต์ในอาหาร C5 ความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5 เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที สามารถผลิตแคโรทีนอยด์สูงขึ้นถึง 1.3 เท่า



ภาพ 14 ปริมาณแคโรทีนอยด์ในเซลล์ยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 ที่เลี้ยงในความเร็วรอบเขย่า 100 150 และ 200 รอบต่อนาที ในวันที่ 5 และวันที่ 7 โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

หมายเหตุ: อักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

เมื่อเปรียบเทียบการเจริญของยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 จากปริมาณเซลล์น้ำหนักแห้ง จากการเลี้ยงด้วยความเร็วรอบในการเขย่า 100 150 และ 200 รอบต่อนาที พบว่า การเลี้ยงยีสต์ในอาหาร YM ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ในวันที่ 7 มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงที่สุด เท่ากับ 7.93±0.46 กรัมต่อลิตร อันดับต่อมา คือ อาหาร C5 ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ในวันที่ 7 มีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 6.96±0.72 กรัมต่อลิตร (มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ) (ดังแสดงในภาพที่ 15)



ภาพ 15 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 ที่เลี้ยงในความเร็วรอบเขย่า 100 150 และ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลาเวลา 5 วัน โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

หมายเหตุ: อักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

การศึกษานี้ พบว่า การเลี้ยง *R. mucilaginosa* UP12 ในอาหารเหลว C5 ปรับพีเอชเท่ากับ 5 ความเร็วรอบเขย่า 150 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ในเซลล์สูงที่สุด เท่ากับ 152.66±20.29 ไมโครกรัมต่อกรัมยีสต์แห้ง พบปริมาณเซลล์น้ำหนักแห้ง เท่ากับ 6.07±0.52 กรัมต่อลิตร และผลผลิตแคโรทีนอยด์ทั้งหมดเท่ากับ 0.93±0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร อันดับต่อมาคือ การเลี้ยงในอาหารเหลว C5 ปรับพีเอชเท่ากับ 5 ความเร็วรอบเขย่า 200 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ในเซลล์ เท่ากับ 147.11±8.84 ไมโครกรัมต่อกรัมยีสต์แห้ง พบปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 6.96±0.72 กรัมต่อลิตร และผลผลิตแคโรทีนอยด์ทั้งหมดเท่ากับ 1±0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร จากข้างต้นจะเห็นได้ว่าการเลี้ยงด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที มีปริมาณผลผลิตสูงกว่า การเลี้ยงด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เนื่องจากการเลี้ยงด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที มีปริมาณเซลล์สูงกว่า แต่ขณะเดียวกันการเลี้ยงด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที พบปริมาณแคโรทีนอยด์ภายในเซลล์ที่สูงกว่า เปรียบเทียบในเชิงคุณภาพความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ภายในเซลล์ของการเลี้ยงในอาหาร C5 ด้วยความเร็ว

เขย่า 150 รอบต่อนาทีมีประสิทธิภาพสูงที่สุด ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความเร็วเขย่าส่งผลต่อการผลิตและการเจริญของเซลล์ยีสต์ เนื่องจากความเร็วรอบในการเขย่าช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวเซลล์ต่อการสัมผัสอาหารและอากาศ เช่นเดียวกับรายงานของ Naghavi FarzanehSadat , Hanachi Parichehr and Saboora Azra (2014) ที่ศึกษาปัจจัยต่างๆต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ของ *R. mucilaginosa* เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว YPG (Yest peptone glucose) ความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5 บ่มอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมงผลิตแคโรทีนอยด์ และน้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 16.33±1.388 มิลลิกรัมต่อกรัม และ 3.930±0.035 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับการรายงานของ Machado et al. (2019) ศึกษาผลการผลิตแคโรทีนอยด์ของ *R.mucilaginosa* URM 7409 ในอาหารเหลว YM (กลูโคส 30 กรัมต่อลิตร สารสกัดมอลต์ 10 กรัมต่อลิตร สารสกัดยีสต์ 2 กรัมต่อลิตร เปปโตน 3 กรัมต่อลิตร) ความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 144 ชั่วโมง โดยทดสอบความเร็วรอบ 130 ถึง 230 รอบต่อนาที พบปริมาณ แคโรทีนอยด์สูงสุดเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเหลว YM ด้วยความเร็ว 130 รอบต่อนาที เท่ากับ 252.99 ไมโครกรัมต่อกรัมยีสต์แห้ง ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 7.4 กรัมต่อลิตร แตกต่างจากการรายงานของ Tinoi, Rakariyatham and Deming (2005) ศึกษาการผลิตแคโรทีนอยด์จากยีสต์ *R. glutinis* ในอาหารที่มีองค์ประกอบของกากถั่วเขียว และกากมันหวาน ความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5 อุณหภูมิ 30.03 องศาเซลเซียส ทดสอบอัตราการปั่นกวน 100-280 รอบต่อนาที พบว่าที่อัตราการการปั่นกวน 258 รอบต่อนาที สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ ได้สูงที่สุด เท่ากับ 3.48±0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร และพบว่าอัตราการปั่นกวนที่ต่ำอาจส่งผลให้ปริมาณเซลล์ลดลงเนื่องจากพื้นผิวของเซลล์ไม่สามารถสัมผัสสารอาหารได้อย่างทั่วถึง แต่อัตราการปั่นกวนที่สูงเกินไปอาจรบกวนการทำงานของผนังเซลล์เนื่องจากการปั่นกวนสูงจะเพิ่มความหนืดและการแยกชั้นของอาหาร

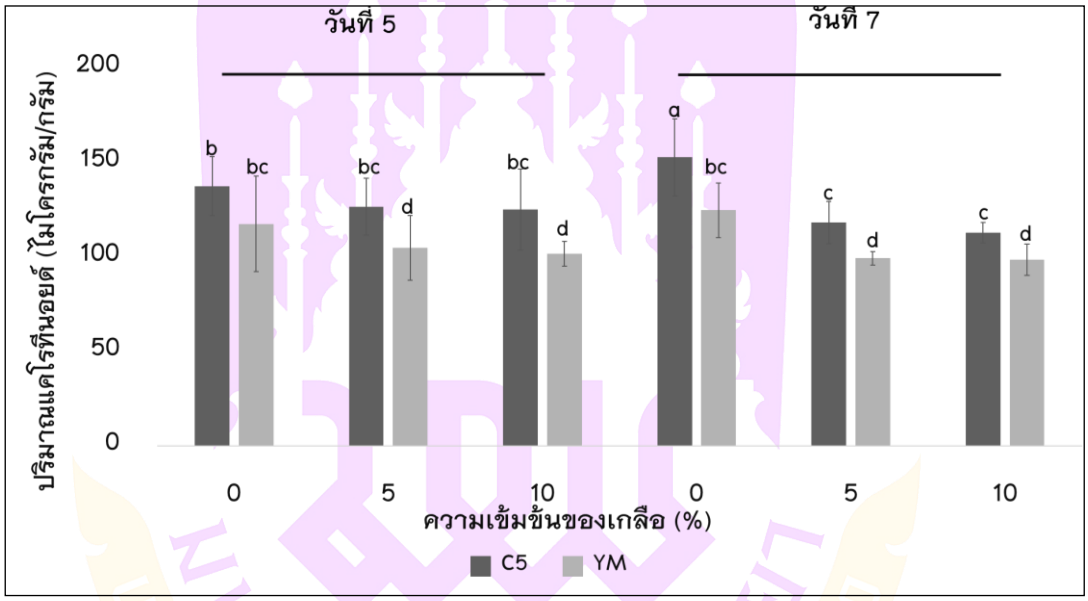
4.ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อการผลิตแคโรทีนอยด์

จากการศึกษาผลของความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ ต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ โดยใช้อาหาร C5 ความเป็นกรด–ด่าง เท่ากับ 5 ที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ เท่ากับ 0 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้อาหารเหลว YM เป็นชุดควบคุม บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน วิเคราะห์แคโรทีนอยด์และน้ำหนักเซลล์แห้ง ในวันที่ 5 และ 7 (ดังแสดงในภาพที่ 16)

ภาพ 16 ตัวอย่างการเจริญของยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 ในอาหาร C5 และ YM ที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณแคโรทีนอยด์ที่สกัดได้จากเซลล์ *R. mucilaginosa* UP12 เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของเกลือต่างกัน พบว่า การเลี้ยงยีสต์ในอาหารที่เติมเกลือ 5

เปอร์เซ็นต์ สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงกว่าในอาหารที่เติมเกลือ 10 เปอร์เซ็นต์ ในทุกอาหารทดสอบ โดยเมื่อเลี้ยงในอาหาร C5 ที่เติมเกลือ 5 เปอร์เซ็นต์ และ 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 วัน สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงที่สุดได้ เท่ากับ 126.62 ± 14.99 และ 125.06 ± 21.37 (ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ) พบว่าสามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้ถึง 137.50 ± 15.52 ไมโครกรัมต่อกรัมยีสต์แห้ง (ดังแสดงในภาพที่ 14) และสามารถผลิตได้สูงขึ้นเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 7 แตกต่างจาก สูตรอาหารที่มีการเติมเกลือ 5 เปอร์เซ็นต์ และ 10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจากผลการทดสอบพบว่าเมื่อเลี้ยงผ่านไปเป็นเวลา 7 วัน มีแนวโน้มในการผลิตแคโรทีนอยด์ลดลง ในทุกชุดการทดลอง (ดังแสดงในภาพที่ 17)

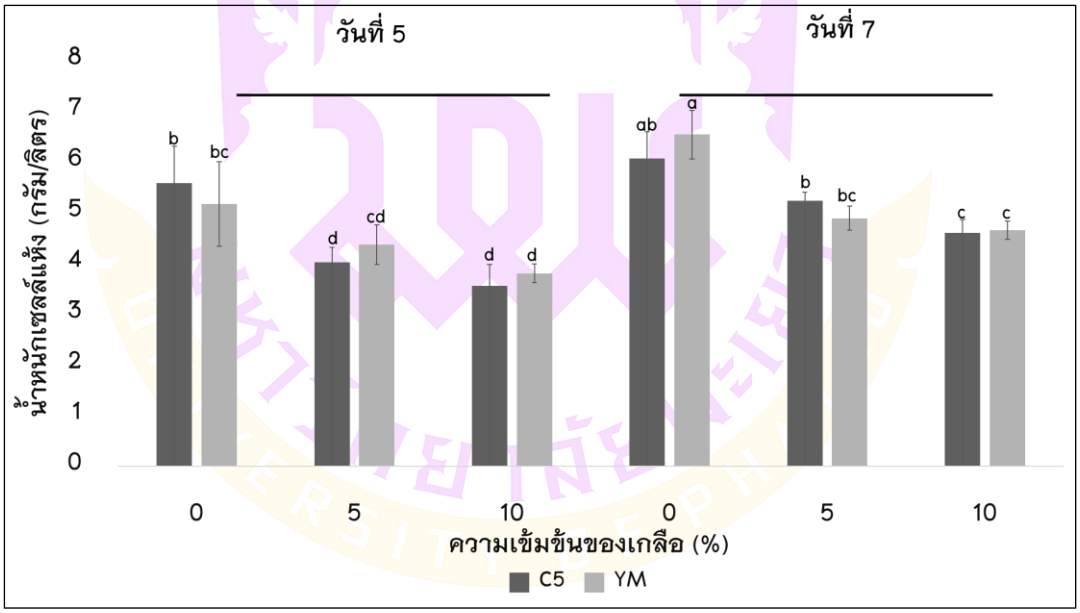


ภาพ 17 ปริมาณแคโรทีนอยด์ในเซลล์ยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 ในอาหาร C5 และ YM ที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 และ 7 วัน

หมายเหตุ : อักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณแคโรทีนอยด์ในอาหาร C5 ที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 7 วัน พบว่า *R. mucilaginosa* UP12 มีศักยภาพในการผลิตแคโรทีนอยด์ลดลงอย่างเห็นได้ชัด โดยสามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้ เท่ากับ 118.21±11.14 112.87±5.43 ไมโครกรัมต่อกรัมยีสต์แห้ง ซึ่งในอาหาร C5 ที่มีความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอ

ไรด์ 0 เปอร์เซ็นต์ สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ เท่ากับ 152.66±20.29 ไมโครกรัมต่อลิตร การเลี้ยง *R. mucilaginosa* UP12 ในอาหารมีเติมเกลือ 5 % ส่งผลให้เชื้อมีศักยภาพในการผลิตแคโรทีนอยด์ลดลง 1.4 เท่า (ดังแสดงในภาพที่ 17) จากการศึกษาผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ พบว่ายีสต์ที่เลี้ยงในอาหารที่เติมเกลือมีประสิทธิภาพในการผลิตแคโรทีนอยด์ลดลง ซึ่งสอดคล้องกับผลของเกลือต่อการเจริญของยีสต์ *R.mucilaginosa* UP12 เมื่อนำมาเปรียบเทียบเปรียบเทียบด้วยน้ำหนักเซลล์แห้งพบว่า การเลี้ยงยีสต์ในอาหารเหลว YM ที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 วัน มีปริมาณน้ำเซลล์หนักแห้ง เท่ากับ 5.16±0.83 4.36±0.38 และ 3.8±0.18 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณเซลล์น้ำหนักแห้ง พบว่าเลี้ยงในอาหารเหลว YM ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ มีเซลล์น้ำหนักแห้งน้อยกว่าการถึง 1.2 เท่า และ 1.4 เท่า ตามลำดับ เช่นเดียวกับการเลี้ยงในอาหาร C5 ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณน้ำเซลล์หนักแห้ง เท่ากับ 5.58±0.72 4.01±0.29 และ 3.55±0.72 ที่มีปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งลดลง 1.4 และ 1.5 เท่า (ดังแสดงในภาพที่ 18)



ภาพ 18 น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 ที่เลี้ยงในอาหารC5 และ YM ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 วัน โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

หมายเหตุ : อักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

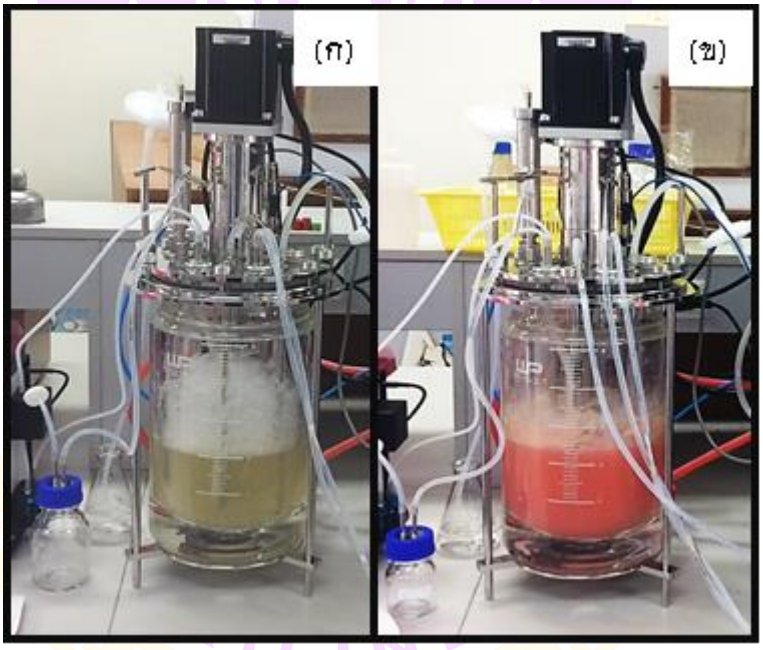
เมื่อปรียบเทียบปริมาณเซลล์น้ำหนักแห้งของ *R. mucilaginosa* UP12 ในอาหาร C5 และ YM ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ จากการเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน มีปริมาณเซลล์น้ำหนักแห้ง เท่ากับ 5.23±0.16 4.6±0.26 4.88±0.23 และ 4.65±0.18 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ดังแสดงในภาพที่ 20) มีปริมาณเซลล์น้ำหนักแห้งสูงขึ้นกว่าวันที่ 5 แต่เมื่อเทียบกับปริมาณเซลล์น้ำหนักแห้งในอาหารที่ไม่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ ที่มีปริมาณเซลล์น้ำหนักแห้งเท่ากับ 6.06±0.52 และ 6.53±0.47 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีปริมาณลดลงอย่างเห็นได้ชัด

จากการศึกษาความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ในอาหารต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ พบว่า เกลือชนิดนี้ไม่มีประสิทธิภาพในการเหนี่ยวนำในการผลิตแคโรทีนอยด์และส่งเสริมการเจริญของเซลล์ อีกทั้งส่งผลให้มีประสิทธิภาพในการผลิตแคโรทีนอยด์และการเจริญของยีสต์ลดลง สอดคล้องกับการรายงานของ Naghavi Hanachi and Parichehr Sabora (2014) ศึกษาผลของเกลือทะเล (Sea salt) ความเข้มข้น 5 10 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเหลว YPG (Yeas peptone glucose medium) ต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์ *R. mucilaginosa* บ่มที่อุณหภมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า ในอาหารที่มีเกลือทะเล (Sea salt) ความเข้มข้น 5 10 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีศักยภาพในการผลิตแคโรทีนอยด์และปริมาณเซลล์น้ำหนักแห้ง ผู้เขียนกล่าวว่าจากการทดลองนี้เกลือทะเลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ไม่มีศักยภาพในการส่งเสริมการเจริญ และผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์ *R. mucilaginosa* เช่นเดียวการรายงานของ Omar and Selim (2020) ศึกษาการผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์ *R. mucilaginosa* ในอาหาร OWE (Orange waste extract) ที่มีความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 1 ถึง 6 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลล์เซียส พบว่าในอาหารที่เติมเกลือโซเดียวคลอไรด์ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ สามารถผลิตแคโรทีนอยด์และเซลล์น้ำหนักแห้งได้สูงที่สุด เท่ากับ 7.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และเซลล์น้ำหนักแห้ง 13.72 กรัมต่อลิตร และพบว่าการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นสูงกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารทำให้ศักยภาพการเจริญของเซลล์และการผลิตแคโรทีนอยด์ลดลง แสดงให้เห็นว่ายีสต์สายพันนี้ไม่มีศักยภาพในการเจริญและผลิตแคโรทีนอยด์ในอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นสูง เช่นเดียวกับการรายงานของ Mahmoud et al. (2014) รายงานว่าการศึกษาความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 1 ถึง 6 เปอร์เซ็นต์ในอาหาร YM โดยใช้อาหารที่ไม่เติมเกลือโซเดียมคลอไรเป็นชุดควบคุม พบว่า เมื่อเลี้ยง *R. glutinis* ในอาหารที่มีความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 1และ 2 เปอร์เซ็นต์ ผลิตแคโรทีนอยด์สูงขึ้น เท่ากับ 132±6 145±7 และ135±6 ไมโครกรัมต่อกรัมยีสต์แห้ง ตามลำดับ มีการผลิตแคโรทีนอยด์และการเจริญลดลงในอาหารที่มีเกลือโซเดีม

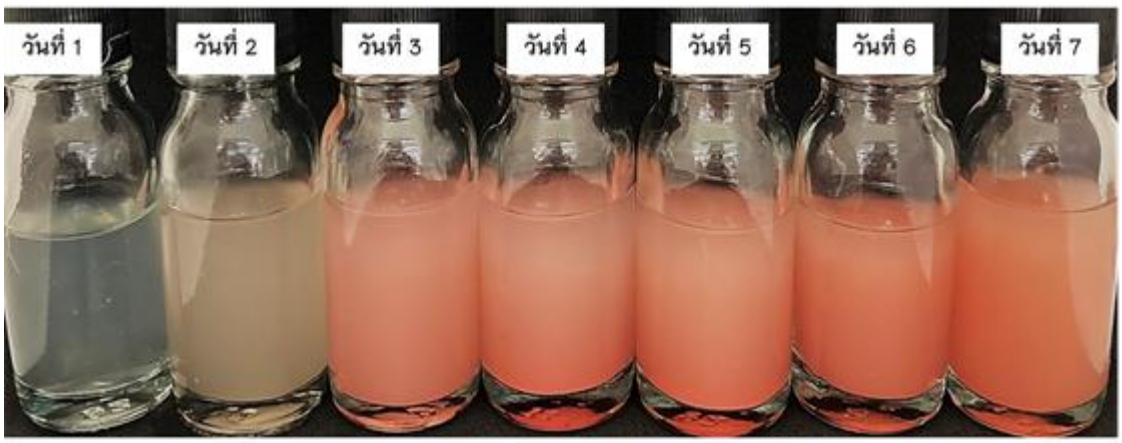
คลอไรด์สูงขึ้น ซึ่งแตกต่างจากการรายงานของ Guo et al. (2019) ศึกษาการผลิตบีต้า–แคโรทีน ของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* SM14 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 โมล มีประสิทธิภาพในการผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงขึ้น ซึ่งสูงที่สุดในอาหารที่มีความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.4 โมล มีประสิทธิภาพในการเหนี่ยวนำให้ผลิตบีต้า–แคโรทีน เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ แต่ขณะเดียวกันอาหารที่มีความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้นส่งผลให้เซลล์มีการเจริญลดลง และการรายงานของ Marova et al. (2004) โดยการผลิตแคโรทีนอยด์ของ *R. rubra* ในอาหารที่มีองค์ประกอบของกลูโคส 30 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 4 กรัมต่อลิตร โมโนโพแทสเซียมฟอตเฟต 4 กรัมต่อลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟต 4 กรัมต่อลิตร ที่มีความเข้มข้นเกลือโซดียมคลอไรด์ 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 80 ชั่วโมง พบว่า มีปริมาณบีต้า–แคโรทีน เท่ากับ 0.59±0.31 และ 0.22±0.05 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเปรียบเทียบปริมาณแคโรทีนอยด์จากการเลี้ยงในชุดควบคุม มีปริมาณ บีต้า–แคโรทีน เท่ากับ 0.08 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง การเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ สามารถผลิตบีต้า–แคโรทีนได้กว่าชุดควบคุม เท่ากับ 7.4 และ 2.8 เท่าตามลำดับ เป็นไปได้ว่าจากการทดลองนี้ที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ในอาหาร 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์เป็นความเข้มข้นที่สูงเกินกว่าจะส่งเสริมการเจริญและการผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12

5. การขยายผลการผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 ด้วยถังหมักในระดับห้องปฏิบัติการ

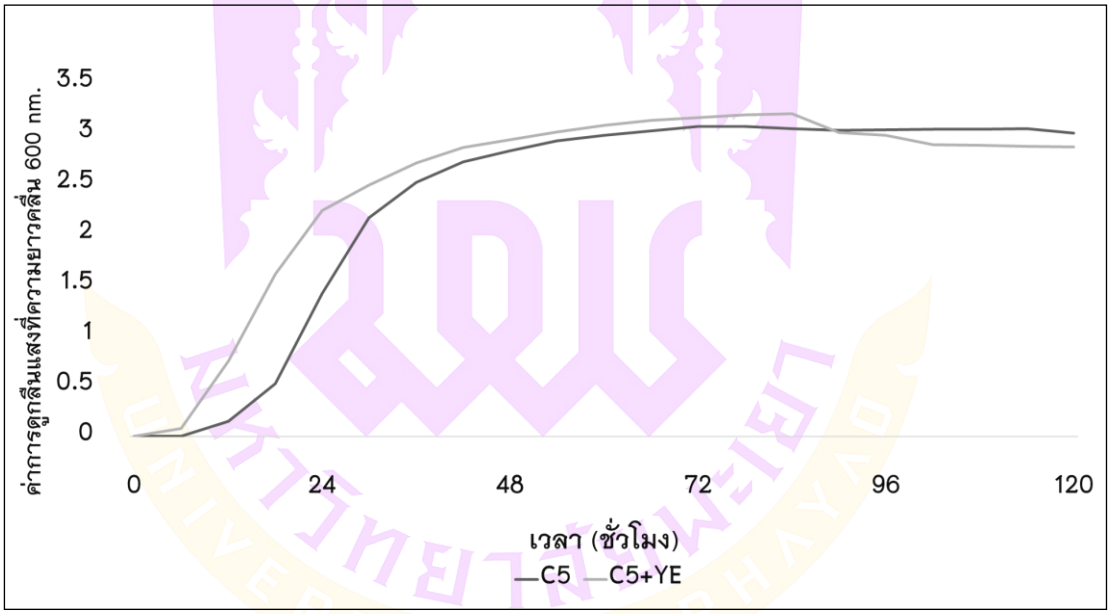
การศึกษาข้างต้นพบว่าการเลี้ยงยีสต์ในอาหาร C5 ที่มี พีเอช 5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงที่สุดในทุกการทดลอง จึงนำมาขยายผลการผลิตในถังหมัก ขนาด 5 ลิตร โดยเลี้ยงแบบกะ (Batch Fermentation) โดยใช้อาหารสูตร C5 จำนวน 1 รอบ และอาหารสูตร C5 ที่เติมสารสกัดยีสต์ 1 กรัมต่อลิตร เพื่อเป็นปัจจัยส่งเสริมการเจริญ จำนวน 1 รอบ ควบคุมความเป็นกรด–ด่างเท่ากับ 5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการปั่นกวน 150 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศอากาศ 0.5 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที (vvm) เป็นเวลา 7 วัน (ดังแสดงในภาพที่ 19 และ 20)



ภาพ 19 ตัวอย่างการเจริญของ *R. mucilaginosa* UP12 โดยใช้อาหาร C5 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ก่อนเติมหัวเชื้อ (ก) และหลังเติมหัวเชื้อเป็นเวลา 5 วัน (ข)

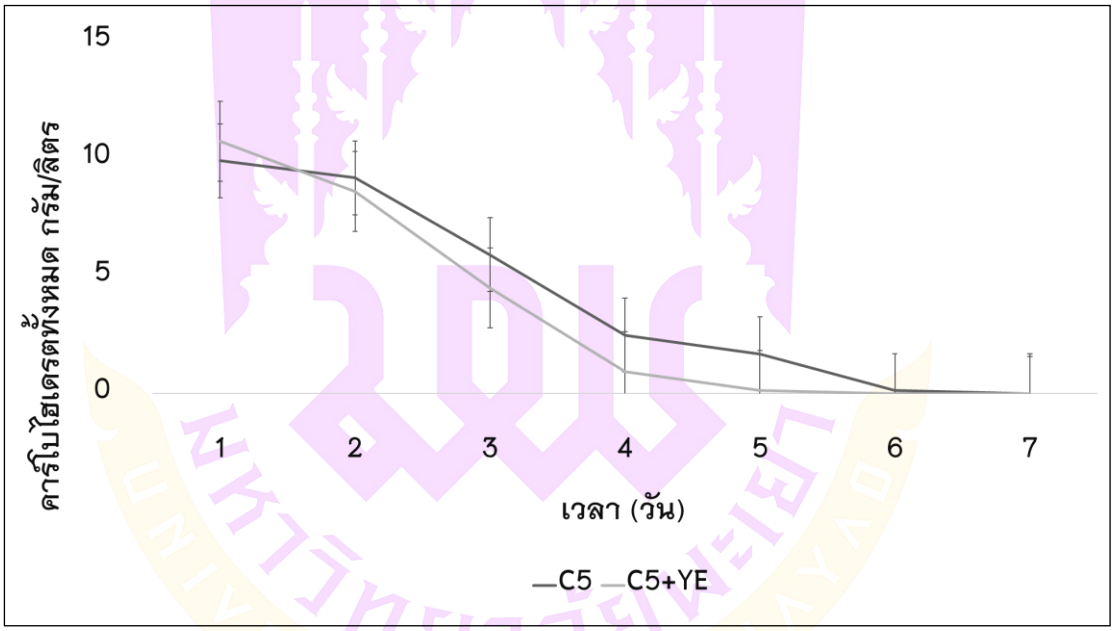


ภาพ 20 ตัวอย่างการเจริญ *R. mucilaginosa* UP12 โดยใช้อาหาร C5 ที่ได้จากถังหมัก เป็นเวลา 7 วัน



ภาพ 21 อัตราการเจริญของยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 วัดอัตราการเจริญโดยการวัดค่าดูกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ทุก 1ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

เมื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญของ *R.mucilaginosa* UP12 ในอาหาร C5 และ C5 ที่เติมสารสกัดยีสต์ 1 กรัมต่อลิตร พบว่าการเลี้ยงในอาหาร C5 ที่เติมสารสกัดยีสต์ เซลล์ใช้เวลาในระยะ lag phase น้อยกว่าและมีอัตราการเจริญสูงกว่า การเลี้ยงในอาหาร C5 (ดังแสดงในภาพที่ 20) ซึ่งเมื่อเทียบอัตราการเจริญ กับ การเปลี่ยนแปลงของปริมาณคาร์โบไฮเดรตระหว่างการเลี้ยง พบว่า การเลี้ยงในอาหาร C5 มีการเปลี่ยนแปลงอย่างช้าๆใน 2 วันแรก ต่ำลงอย่างเห็นได้ชัดในวันที่ 3 และหมดลงในวันที่ 6 มีความสอดคล้องกับอัตราการเจริญ ในภาพที่ 20 เนื่องจากการเลี้ยงในอาหาร C5 ใช้เวลาในช่วง lag phase นานกว่า จึงทำให้สารอาหารไม่ได้ถูกใช้ในช่วงแรกเนื่องจากเป็นช่วงที่เซลล์ใช้เวลาในการปรับตัวในอาหาร ต่างจากการเลี้ยงในอาหาร C5 ที่เติมสารสกัดยีตส์ ที่ใช้เวลาในระยะ lag phase น้อยกว่าและใช้สารอาหารอย่างรวดเร็วและหมดลงในวันที่ 5 (ดังแสดงในภาพที่ 24)



ภาพ 22 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดในอาหารระหว่างการผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 เป็นเวลา 7 วัน

จากการศึกษาการผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 ในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการขนาด 5 ลิตร ด้วยอาหาร C5 สามารถผลิตได้สูงที่สุด เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 6 วัน เท่ากับ 173.93±4.41 ไมโครกรัมต่อกรัมยีสต์แห้ง น้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 6.9 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน พบว่าปริมาณแคโรทีนอยด์ และน้ำหนักเซลล์แห้งลดลง อย่างมี

นัยสำคัญ ดังตารางที่ 3 เปรียบเทียบจากการทดลองที่ 3 โดยการเลี้ยงยีสต์ด้วยอาหาร C5 ที่สภาวะเดียวกัน (shake flask) ซึ่งสามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้ เท่ากับ 152.66 ไมโครกรัมต่อกรัมยีสต์แห้ง เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน จากการทดลองนี้พบว่า มีประสิทธิภาพในการผลิตแคโรทีนอยด์สูงกว่าการทดลองก่อนหน้าประมาณ 1.2 เท่า รวมถึงสามารถลดเวลาการผลิตเหลือเพียง 6 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงยีสต์ในอาหาร C5 ที่เติมสารสกัดยีสต์ 1 กรัมต่อลิตร ในถังหมัก ขนาด 5 ลิตร ที่มี pH 5 อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน พบว่า เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ และน้ำหนักเซลล์แห้ง ได้สูงที่สุด โดยสามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้ เท่ากับ 194.72 ±1.30 ไมโครกรัมต่อกรัมยีสต์ น้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 7.68±0.144 กรัมต่อลิตร และพบว่าปริมาณแคโรทีนอยด์และ น้ำหนักเซลล์แห้งลดลง อย่างมีนัยสำคัญ ในวันที่ 6 และ 7 ดังตารางที่ 3

ตาราง 6 ปริมาณแคโรทีนอยด์ และปริมาณน้ำหนักแห้งจากการเลี้ยงยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 ในถังหมักระดับห้องปฏิการ

เวลา (วัน)	อาหารสูตร C5				อาหารสูตร C5 ที่เติมสารสกัดยีสต์ 2 กรัม/ลิตร			
	Carbohydrate (g/L)	TCC (μg/g)	CDW (g/L)	Yield (mg/L)	Carbohydrate (g/L)	TCC (μg/g)	CDW (g/L)	Yield (mg/L)
1	9.80	0	0	0	10.63	0	0	0
2	8.30	23.29	0.88	0.02	8.49	74.42	1.78	0.13
3	5.10	41.32	1.80	0.07	4.38	82.27	4.17	0.34
4	2.38	96.60	3.62	0.35	1.66	153.06	6.43	0.98
5	1.22	133.50	5.73	0.76	0.16	194.83	7.68	1.5
6	0.02	173.93	6.90	1.2	0	160.31	7.37	1.2
7	0	147.69	6.73	1	0	138.35	7.13	1

หมายเหตุ: ตัวย่อ TCC คือ Total Carotenoid Content หรือ ปริมาณแคโทนอยด์ทั้งหมด และ CDW คือ Cell Dry Weight หรือ ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง

ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบด้วยการเลี้ยงในถังหมักด้วยอาหาร C5 พบว่า การทดลองนี้สามารถผลิตได้สูงกว่า 1.2 เท่า (ปริมาณแคโรทีนอยด์และน้ำหนักเซลล์แห้ง) เมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงในสภาวะเดียวกันด้วยอาหาร C5 (Shake flask) การทดลองนี้สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงกว่าถึง 1.3 เท่า และน้ำหนักเซลแห้งสูงกว่า 1.3 เท่า เช่นกัน อีกทั้งการทดลองนี้ยังสามารถลดเวลาการผลิตแคโรทีนอยด์ลง 2 วัน ซึ่งเวลาในการผลิตถือเป็นปัจจัยสำคัญในกระบวนการผลิตเนื่องจากส่งผลต่อต้นทุนการผลิต เช่นเดียวกับปริมาณแคโรทีนอยด์ ปริมาณเซลล์น้ำหนักแห้งที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เช่นเดียวกับรายงานของ Malisorn and Suntornsuk (2008) ศึกษาการใช้น้ำหมักหัวไช้เท้าในการผลิตแคโรทีนอยด์โดยยีสต์ *R. glutinis* DM28 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลล์เซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ และเซลล์น้ำหนักแห้ง เท่ากับ 178 ไมโครกรัมต่อลิตร และ 2.3 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อขยายผลผลิตในถังหมักในระดับห้องปฏิบัติการ ขนาด 3 ลิตร ด้วยสภาวะการเลี้ยงเดียวกันที่มีปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ 80% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสามารถผลิตแคโรทีนอยด์ และเซลล์น้ำหนักแห้ง เท่ากับ 201 ไมโครกรัมต่อลิตร และ 2.7 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ สามารถผลิตแคโรทีนอยดด์เพิ่มขึ้น 15 เปอร์เซ็นต์ และรายงานของ Sharma and Ghoshal (2019) ศึกษาการผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์ *R. mucilaginosa* MTCC–1403 โดยใช้ผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมการเกษตร พบว่าการใช้อาหารที่ได้จากสารสกัดเปลือกหัวหอม และ เปลือกถั่วเขียว ปรับพีเอช เท่ากับ 6 บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 110 รอบต่อนาที เป็นเวลา 84 ชั่วโมง สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงที่สุดเท่ากับ 717.35 ไมโครกรัมต่อกรัมยีสต์แห้ง เมื่อขยายผลผลิตในถังหมักในระดับห้องปฏิบัติการขนาด 3 ลิตร เติมอากาศ 1 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที (vvm) พบว่าสามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้ เท่ากับ 819.23 ไมโครกรัมต่อกรัมยีสต์แห้ง สูงกว่าการเลี้ยงแบบเขย่าฟลาสก์ 1.1 เท่า

จากรายงานนี้พบปริมาณแคโรทีนอยด์สูงกว่าที่ได้จากยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 ที่เลี้ยงในอาหาร C5 ที่เติมสารสกัดยีสต์ 1 กรัมต่อลิตร และพบว่า การเลี้ยงในอาหารC5 ที่เติมสารสกัดยีสต์ สามารถเร่งอัตราการเจริญลดระยะจาก lag phase เข้าสู่ log phase อย่างรวดเร็ว รวมถึงอัตราการเจริญใน stationary phase ที่สูงขึ้นกว่าการเลี้ยงด้วยอาหาร C5 ที่เริ่มเข้าสู่ log phase ในชั่วโมงที่ 17 และเริ่มมีการเจริญคงที่ ซึ่งแตกต่างจากการเลี้ยงในอาหาร C5 ที่เติมสารสกัดยีสต์ซึ่งเริ่มมีการเจริญคงที่ ในชั่วโมงที่ 50 และมีการเจริญลดลงอย่างเห็นได้ชัดในชั่วโมงที่ 90 (ดังแสดงในภาพที่ 20) สอดคล้องกับ Chanchay et al. (2012) ศึกษาความเหมาะสมของสารอาหารสำหรับการผลิตแคโรทีนอยด์ ของยีสต์ *R. rubra* ในอาหาร Basal medium ที่เติมปัจจัยส่งเสริมการเจริญ คือ เปปโตน และสารสกัดยีสต์ 1 กรัมต่อลิตร บ่มที่

อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเขย่า 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าเลี้ยงยีสต์ในอาหารที่เติมสารสกัดยีสต์ สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงที่สุด เท่ากับ 30.39 ไมโครกรัมต่อกรัมยีสต์แห้ง และมีการรายงานการใช้สารสกัดยีสต์เพื่อการเพาะเลี้ยงเซลล์ เนื่องจากในสารสกัดยีสต์มีสารอาหารหลากหลายเช่น กรดอะมิโน ไนโตรเจน คาร์บอน และไวตามิน (Chan, Greenfield and Reid, 1998) จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าสามารถใช้อาหาร C5 ในการผลิตแคโรทีนอยด์ได้ ซึ่งมีประสิทธิภาพเทียบเท่าการเลี้ยงในอาหารเหลว YM อย่างไรก็ตามผลการผลิตแคโรทีนอยด์ในอาหาร C5 จากการศึกษานี้ มีปริมาณแคโรทีนอยด์ต่ำกว่าจากการรายงานในข้างต้นอย่างเห็นได้ชัด เป็นไปได้ว่า อาหารสูตร C5 ที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตแคโรทีนอยด์จากการศึกษาครั้งนี้ มีความเข้มข้นของคาร์บอน ไนโตรเจน ไม่เหมาะสมต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ ดังนั้นการศึกษาต่อไปนอกจากหาสูตรอาหารและสภาวะการเลี้ยงยีสต์ที่เหมาะสมมากขึ้นแล้ว ควรศึกษาความเข้มข้นของสารอาหารประเภทแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจน ที่เหมาะสมต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ ดังรายงานของ Machado et al. (2019) ศึกษาปริมาณสารอาหารจากสูตรอาหาร YM ที่เหมาะสมต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์ *R. mucilaginosa* URM 7409 โดยศึกษาความเข้มข้น กลูโคส 10 ถึง 30 กรัมต่อลิตร สารสกัดยีสต์ 1 ถึง 5 กรัมต่อลิตร เปปโตน 1 ถึง 10 กรัมต่อลิตร และสารสกัดมอลต์ 1 ถึง 5 กรัมต่อลิตร ระดับพีเอช 4 ถึง 6 อุณภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเขย่า 130 รอบต่อนาที เป็นเวลา 144 ชั่วโมง พบปริมาณแคโรทีนอยด์สูงสุด เมื่อเลี้ยงในอาหาร YM ที่มีกลูโคส 30 กรัมต่อลิตร สารสกัดมอลต์ 10 กรัมต่อลิตร สารสกัดยีสต์ 2 กรัมต่อลิตร และเปปโตน 3 กรัมต่อลิตร เท่ากับ 252.99 ไมโครกรัมต่อกรัมยีสต์แห้ง มีปริมาณสูงกว่าในอาหาร YM ก่อนปรับความเข้มข้นของสารอาหารที่มีปริมาณแคโรทีนอยด์ เท่ากับ 100.94±9.21 ไมโครกรัมต่อกรัมยีสต์แห้ง มีเพิ่มขึ้น 2.5 เท่า รวมถึงการปรับปรุงสายพันธุ์ก็เป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถนำมาใช้เพื่อพัฒนาการผลิตแคโรทีนอยด์ *R. mucilaginosa* UP12 ตัวอย่างเช่นในรายงานการปรับปรุงยีสต์ *R. mucilaginosa* KC8 โดยใช้เทคนิคการกลายพันธุ์ร่วมกับการส่งถ่ายยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างสารแคโรทีนอยด์ทำให้ผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงกว่าเดิมถึง 121 % (Qiang et al., 2017) การขยายปริมาณการผลิตแคโรทีนอยด์โดยยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 ยังคงต้องมีการศึกษาต่อไปเพื่อนำไปสู่การผลิตที่คุ้มค่าทางเศรษฐกิจและตรงตามความต้องการของผู้ผลิตแคโรทีนอยด์ในระดับอุตสาหกรรม

บทที่ 5

บทสรุป

สรุปผลการวิจัย

1. ศึกษาสูตรอาหารและสภาวะที่เหมาะสมเพื่อการผลิตแคโรทีนอยด์จากยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 โดยมีน้ำล้างปลาจากโรงงานปลาส้มเป็นองค์ประกอบ ร่วมกับการเติมแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนเพิ่มเติม

การศึกษาสูตรอาหารจากน้ำทิ้งโรงงานผลิตปลาส้มและความเป็นกรด–ด่าง ต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 พบว่าเมื่อเลี้ยงในอาหาร C5 ที่มีองค์ประกอบของน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตปลาส้ม ที่เติมน้ำตาลซูโครส 10 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอช เท่ากับ 5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงที่สุด รองลงมาคืออาหาร YM จึงนำอาหารสูตร C5 มาทำการศึกษาต่อในการหาอัตราความเร็วรอบที่เหมาะสมต่อการผลิตแคโรทีนอยด์กำหนดความเร็วรอบเขย่าในการทดสอบ คือ 100 150 และ 200 รอบต่อนาที โดยศึกษาเปรียบเทียบกับ อาหารสูตร C1 และอาหาร YM ที่เป็นชุดควบคุม พบว่า เมื่อเลี้ยงในอาหาร C5 ปรับพีเอช เท่ากับ 5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงที่สุด และยังพบว่าความเร็วรอบในการเขย่าที่สูงขึ้นส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของปริมาณเซลล์ ซึ่งพบปริมาณเซลล์แห้งสูงที่สุดในการเลี้ยงด้วยอาหาร YM ปรับพีเอช เท่ากับ 5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน และจากการศึกษาความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร C5 ต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ ของยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 พบว่า *R. mucilaginosa* UP12 ไม่มีศักยภาพในการผลิตแคโรทีนอยด์เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีเกลือความเข้มข้น 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ จึงสรุปได้ว่าอาหาร C5 ที่เติมสารสกัดยีสต์มีประสิทธิภาพสูงที่สุด รองลงมาคือ สูตรอาหาร C5 โดยต้นทุนราคาอาหารของ C5 ที่เติมและไม่เติมสารสกัดยีสต์มีราคา เท่ากับ 5.4 และ 3 บาทต่อลิตร ตามลำดับ เปรียบเทียบกับอาหาร YM ที่มีต้นทุนค่าอาหาร เท่ากับ 54 บาทต่อลิตร การใช้อาหาร C5 ที่เติมและไม่เติมสารสกัดยีสต์สามารถลดต้นทุนค่าอาหารเลี้ยงเชื้อได้เท่ากับ 10 เท่า และ 18 เท่า ตามลำดับ (ดังแสดงในตารางที่ 7)

2.การขยายผลการผลิตแคโรทีนอยด์การขยายการผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 ด้วยถังหมักในระดับห้องปฏิบัติการ

จากการขยายผลการผลิตแคโรทีนอยด์ด้วยอาหารสูตร C5 และ C5 ที่เติมสารสกัดยีสต์ 1 กรัมต่อลิตร ในถึงหมักระดับห้องปฏิบัติการ ขนาด 5 ลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการปั่นกวน 150 รอบต่อนาที อัตราการเติมอากาศ 0.5 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที (vvm) เป็นเวลา 7 วัน พบว่าการเลี้ยง C5 ที่เติมสารสกัดยีสต์ 1 กรัมต่อลิตร สามารถผลิต แคโรทีนอยด์ได้สูงที่สุดในวันที่ 4 เท่ากับ 194.83 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 7.68 กรัมต่อลิตร มีปริมาณปริมาณแคโรทีนอยด์สูงกว่าการเลี้ยงในอาหาร C5 ด้วยขวดเขย่า 1.25 เท่า

ตาราง 7 ต้นทุนอาหารเลี้ยงเชื้อจากน้ำทิ้งอุตสาหกรรมผลิตปลาส้มสำหรับการผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12

อาหารเลี้ยงเชื้อ	ต้นทุนราคาอาหาร (บาท/ลิตร)	ผลผลิตแคโรทีนอยด์ (มิลลิกรัม/ลิตร)
YM	54	0.8
C5	3	1.2
C5+YE	5.4	1.5

ข้อเสนอแนะ

ข้อเสนอแนะในการนำผลการจิวัยไปใช้

อาหารจากน้ำทิ้งโรงงานผลิตปลาส้ม ในครั้งนี้ อาจเป็นประโยชน์สำหรับการนำมาใช้เป็นแนวทางในการศึกษาการผลิตแคโรทีนอยด์จากแหล่งอาหารต้นทุนต่ำ เช่น ผลพลอยได้และของเสียจากอุตสาหกรรมอื่น เพื่อพัฒนาการผลิตแคโรทีนอยด์จากแหล่งอาหารต้นทุนต่ำให้มีประสิทธิภาพการผลิตเพิ่มขึ้น รวมถึงความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของสารอาหารต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ของยีสต์ *R. mucilaginosa* ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูง จึงเป็นที่น่าสนใจในการนำแคโรทีนอยด์ที่ได้จากยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 ไปใช้เป็นส่วนประกอบของของอาหาร เช่น สีผสมอาหาร อาหารสัตว์ เช่น อาหารปลากัด ปลาเทาซ์ กุ้งก้ามกาม และอาหารไก่พันธุ์ไข่ เป็นต้น

ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยครั้งต่อไป

แคโรทีนอยด์ที่ได้จากยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 ยังมีปริมาณที่ต่ำกว่าจากการรายงานอื่นๆ จึงควรมีการศึกษาในเรื่องอัตราส่วน และความเข้มข้นของสารอาหาร เช่นปริมาณน้ำตาลที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาณสารอินทรีย์ และอนินทรีย์ที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน รวมถึงปัจจัยส่งเสริมการเจริญอื่นๆ ที่เหมาะสมต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ รวมถึงศึกษาการปรับปรุงสายพันธุ์ของยีสต์ เช่น การตัดต่อเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์เพื่อเพิ่มโอกาสการผลิตแคโรทีนอยด์ที่สูงขึ้น การตัดต่อยีนเพื่อกระตุ้นการแสดงออกของยีสต์ในการผลิตแคโรทีนอยด์ และการทำให้เกิดการกลายพันธุ์เพื่อเหนี่ยวนำเพื่อเพิ่มการผลิตแคโรทีนอยด์ภายในเซลล์ เพื่อผลิตแคโรทีนอยด์จาก *R. mucilaginosa* UP12 อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด ทั้งเชิงปริมาณ และเชิงคุณภาพ

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Yeast malt broth

1.1 สารสกัดยีสต์ (Yeast extract)	3 กรัม
1.2 สารสกัดมอลต์ (Malt extract)	3 กรัม
1.3 เปปโตน (Peptone)	5 กรัม
1.4 น้ำตาลกลูโคส (Glucose)	10 กรัม
1.5 น้ำกลั่น	1 ลิตร

2. Yeast malt Agar

1.1 สารสกัดยีสต์ (Yeast extract)	3 กรัม
1.2 สารสกัดมอลต์ (Malt extract) 3 กรัม	
1.3 เปปโตน (Peptone)	5 กรัม
1.4 น้ำตาลกลูโคส (Glucose)	10 กรัม
1.5 ผงวุ้น (Agar)	15 กรัม
1.5 น้ำกลั่น	1 ลิตร

ทำให้ปราศจากเชื้อโดยเครื่องนึ่งความดันไอ (Auto clave) อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. Blood Agar

3.1 Blood agar base	40 กรัม
3.2 วุ้น (Agar)	5 กรัม
3.3 เลือด (Blood)	50 มิลลิลิตร
3.4 น้ำกลั่น	1 ลิตร

ชั่ง Blood agar base 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ปรับพีเอช เท่ากับ 7.5 ทำให้ปราศจากเชื้อโดยเครื่องนึ่งความดันไอ (Auto clave) อุณหภูมิ 121 องศา–เซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง จนอุณหภูมิอาหารลดลงเหลือ 55–60 องศาเซลเซียส เติมเลือดลงในอาหาร 50 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน และเทลงบนจานอาหาร

ภาคผนวก ข การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. การวิเคราะห์ปริมาณซีโอดี (Chemical Oxygen Demand) (APHA, AWWA and WPCF, 2005)

1.1 การเตรียมสารเคมี

1.1.1 สารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมตเข้มข้น 0.1 นอร์มอล

ละลายโพแทสเซียมไดโครเมต ($K_2Cr_2O_7$) ซึ่งอบแห้งที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จำนวน 4.913 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (Conc. H_2SO_4) 167 มิลลิลิตร เติมเมอร์คิวริตซัลเฟต 33.3 กรัม คนให้ละลายตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

1.1.2 สารละลายกรดซัลฟิวริก (Digestion reagent)

ละลายซิลเวอร์ซัลเฟต (Ag_2SO_4) 10.11 กรัม ในกรดซัลฟิลริคเข้มข้น (Conc.–H_2SO_4) คนช้าๆจนกว่าซิลเวอร์ซัลเฟตจะละลายหมด (ซิลเวอร์ซัลเฟตละลายช้า อาจใช้เวลาทำลาย 1–2 วัน)

1.1.3 สารละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต (FAS) ควาเข้มข้น 0.1 โมลาร์

ละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต [$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2.6H_2O$] 39.2 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (Conc. H_2SO_4) 20 มิลลิลิตร คนให้ละลายทิ้งไว้ให้เย็น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร สารละลายนี้ต้องเทียบมาตรฐานกับสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมตที่ใช้ในการย่อยสลายก่อนนำมาใช้

1.1.4 สารละเฟอโรอีนอินดิเคเตอร์ (Ferroin indicator)

ละลาย 1–10 ฟีแนนโทลีนโมโนไฮเดรต ($C_{12}H_8N_2.H_2O$) จำนวน 1.485 กรัม และเฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$) 0.695 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

1.2 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณซีโอดี

เจือจางน้ำตัวอย่าง 10 เท่า โดยการดูดน้ำตัวอย่าง 1 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร ดูดน้ำตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดสำหรับวิเคราะห์ COD เติม digestion reagent 2 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 98% 22 มิลลิลิตร นำหลอดทดลองทั้งหมดใส่ลงในเตาย่อยสำหรับวิเคราะห์ COD อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทำให้เย็นโดยการวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง เทตัวอย่างจากหลอดทดลองลงในขวดรูปชมพู่ เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร แล้วนำมาไทเทรตกับสารละลาย

FAS จนกระทั้งถึงจุดยุติ จะเห็นการเปลี่ยนแปลงจากสีเหลืองเป็นสีฟ้าอมเขียวและเป็นสีน้ำตาลแดงที่จุดยุติ อ่านปริมาตรที่ไทเทรตตอนเริ่มเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาลแดงทันที
คำนวณด้วยสมการ ดังนี้

$$\text{ความเข้มข้นของสารละลายเฟอรัสซัลเฟต} = \frac{\text{ปริมาณโพแทสเซียมไดโคเมต } (K_2Cr_2O_7) \text{ (มล.)}}{\text{เฟอร์รัสแอมโมเนียมซัลเฟต } (Fe\ (NH_4)_2(SO_4)_2}$$

2. การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด ด้วยวิธีฟินอลซัลฟิวริค (Dubois et al. 1956)

2.1 การเตรียมสารเคมี

2.1.1 สารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 2.5 นอร์มอล

เติมกรดไฮโดรคลอริก (HCl) 91 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

2.1.2 สารละลายฟีนอล ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็น

ละลายฟีนอล 50 กรัมในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

2.1.3 สารมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

ชั่งน้ำตาลกลูโคส 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นำมาทำสารละลายมาตรฐานโดยทำการเจือจาง 10 เท่า (นำ stock solution 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร)

2.2 เตรียมตัวอย่างตามการวิเคราะห์ anthrone method

ดูดน้ำตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร เติมกรด 2.5 N HCl จำนวน 5 มิลลิลิตร นำไปต้มในอ่างน้ำเดือด 3 ชั่วโมงจากนั้นเติมโซเดียมคาร์บอเนต เพื่อปรับให้มีสภาวะเป็นกลาง โดยเติมจนกว่าจะไม่มีฟองเกิดขึ้น และปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ปิเปตตัวอย่าง 0.2 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้ครบ 1 มิลลิลิตร และเตรียม blank เพื่อใช้เปรียบเทียบ โดยใช้น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอล ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้น 98 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นใส่ลงในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที อ่านค่าดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร และนำมาคำนวณด้วยสมการจากกราฟมาตรฐานกลูโคส

ภาคผนวก ค ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

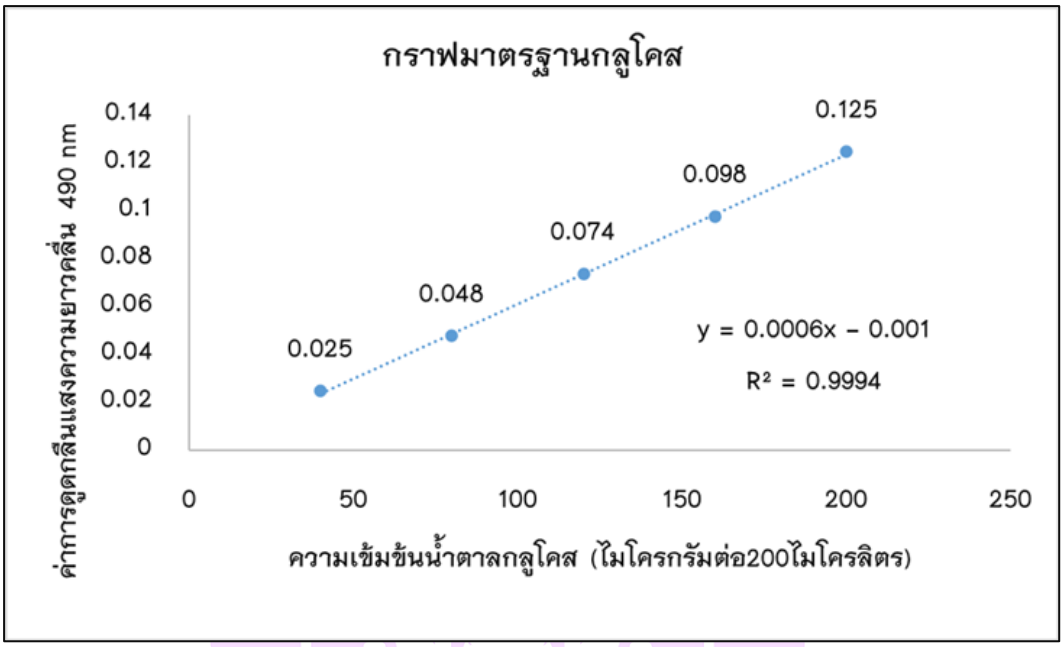
ทดสอบการย่อยเม็ดเลือดแดงของยีสต์ *Rhodotorula mucilaginosa* UP12

ภาพ 23 การย่อยสลายเม็ดเลือดแดงของยีสต์ *R. mucilaginosa* UP12 บนอาหาร Blood agar บ่มอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ผลการวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด

กราฟมาตรฐานกลูโค

ความเข้มข้น (μg/200μl)	γ490
0	0
40	0.028
80	0.055
120	0.081
160	0.106
200	0.131



ภาพ 24 กราฟมาตรฐานกลูโคสที่มีความเข้มข้น 40 80 120 160 และ 200 ไมโครกรัมต่อ 200 ไมโครลิตร

ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด

1.ปริมาณคาโบไฮเดรตทั้งหมดจากการศึกษาสูตรอาหาร และความเป็นกรด-ด่าง ที่มีผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์

ตาราง 8 ปริมาณคาโบไฮเดรตทั้งหมดในอาหารที่มีระดับพีเอช เท่ากับ 4

สูตรอาหาร	วันที่ 0	วันที่ 5	วันที่ 7	วันที่ 9
C1	3.59±0.32	2.09±0.12	0.90±0.02	0.26±0.02
C2	7.45±0.98	3.78±0.31	1.59±0.07	0.32±0.02
C3	3.56±0.23	2.42±0.04	0.79±0.03	0.26±0.03
C4	3.34±0.34	1.98±0.12	0.73±0.03	0.23±0.02
C5	6.95±0.87	3.59±0.21	1.95±0.02	0.32±0.04
C6	7.09±1.02	4.03±0.22	1.56±0.06	0.32±0.01
YM	7.17±1.08	3.48±0.23	1.56±0.05	0.31±0.02

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

ตาราง 9 ปริมาณคาโบไฮเดรตทั้งหมดในอาหารที่มีระดับพีเอช เท่ากับ 5

สูตรอาหาร	วันที่ 0	วันที่ 5	วันที่ 7	วันที่ 9
C1	2.98±041	1.57±0.02	0.87±0.02	0.26±0.01
C2	7.18±1.01	2.73±0.02	1.76±0.03	0.29±00.02
C3	3.57±0.67	1.78±0.02	0.87±0.02	0.23±0.02
C4	3.51±0.33	1.48±0.04	2.46±0.05	0.28±0.02
C5	7.59±0.82	1.73±0.03	1.90±0.04	0.34±0.03
C6	7.40±0.91	2.07±0.02	1.98±0.03	0.34±0.01
YM	7.54±0.66	3.23±0.03	2.23±0.03	0.31±0.01

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

ตาราง 10 ปริมาณคาโบไฮเดรตทั้งหมดในอาหารที่มีระดับพีเอช เท่ากับ 6

สูตรอาหาร	วันที่ 0	วันที่ 5	วันที่ 7	วันที่ 9
C1	3.73±0.76	2.62±0.23	1.12±0.07	0.21±0.01
C2	7.40±1.12	4.57±0.25	1.09±0.05	0.18±0.02
C3	3.57±0.65	2.40±0.33	0.46±0.03	0.21±0.01
C4	3.57±0.44	1.87±0.17	0.62±0.05	0.18±0.02
C5	7.43±0.97	3.68±0.32	1.37±0.06	0.29±0.02
C6	7.18±0.76	4.09±0.36	1.98±0.02	0.34±0.02
YM	8.34±0.77	3.90±0.32	1.96±0.03	0.29±0.02

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

2.ปริมาณคาโบไฮเดรตทั้งหมดจากการศึกษาความเร็วรอบในการเขย่า ที่มีผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์

ตาราง 11 ปริมาณคาโบไฮเดรตทั้งหมดจากการเลี้ยง *R. mucilaginosa* UP12 ด้วยความเร็วรอบเขย่า 150 รอบต่อนาที

สูตรอาหาร	วันที่ 0	วันที่ 5	วันที่ 7
C1	3.66±0.2	1.81±0.01	0.3±0.05
C5	8.07±0.46	3.36±0.26	0.4±0.06
YM	8.32±0.38	2.83±0.3	0.39±0.02

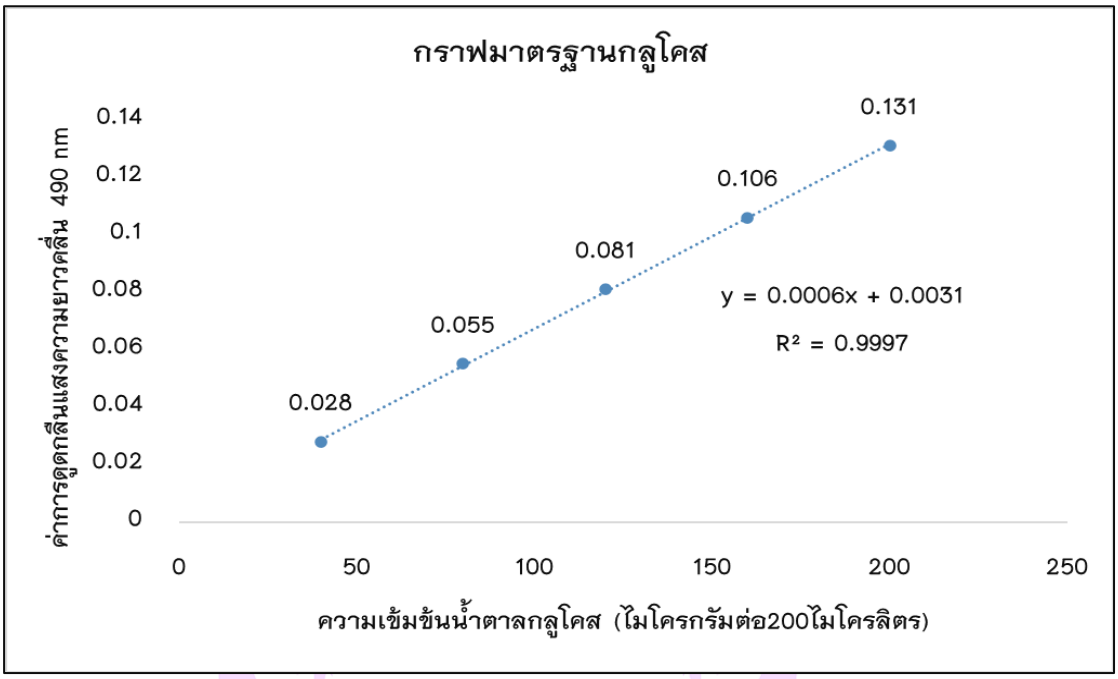
หมายเหตุ: ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

ตาราง 12 ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดจากการเลี้ยง *R. mucilaginosa* UP12 ด้วยความเร็วรอบเขย่า 200 รอบต่อนาที

สูตรอาหาร	วันที่ 0	วันที่ 5	วันที่ 7
C1	3.66±0.2	1.67±0.09	0.214±0.48
C5	8.07±0.46	3.06±0.25	0.35±0.05
YM	8.32±0.38	2.51±0.13	0.18±0.03

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

3. ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดจากการเลี้ยง *R. mucilaginosa* UP12 ในอาหารที่มีความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์



ภาพ 25 กราฟมาตรฐานกลูโคสที่มีความเข้มข้น 40 80 120 160 และ 200 ไมโครกรัมต่อ 200 ไมโครลิตร

ตาราง 13 ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดจากการเลี้ยง *R. mucilaginosa* UP12 ในอาหารที่มีความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 5 และ 10 เปอร์เซ็น

สูตรอาหาร	วันที่ 0	วันที่ 5	วันที่ 7
C5 + 5% NaCl	8.07±0.51	3.93±0.52	0.49±0.08
YM +5% NaCl	8.51±0.34	2.75±0.26	0.25±0.004
C5 + 10% NaCl	7.95±0.02	4.45±0.25	0.54±0.06
YM + 10% NaCl	8.45±0.27	2.63±0.18	0.32±0.01

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

ผลการวิเคราะห์ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด

ตาราง 14 ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด จากการศึกษาสูตรอาหาร และความเป็นกรด–ด่างที่มีผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ (ไมโครกรัมต่อกรัม)

สูตรอาหาร	pH4	pH5	pH6
C15	21.27^{f}±0.10	29.40^{k}±4.00	26.80^{f}±7.16
C25	37.69^{g}±2.32	40.92^{ij}±2.47	33.78^{ef}±3.83
C35	31.65^{g}±2.28	44.86^{k}±4.46	28.88^{f}±2.12
C45	38.39^{g}±8.86	42.49^{hij}±4.99	38.04^{cdf}±11.00
C55	57.18^{efg}±1.71	54.40^{efgh}±0.61	49.85^{cd}±2.22
C65	45.92^{fg}±4.88	50.15^{hij}±7.25	38.42^{cdf}±2.25
YM5	64.28^{cd}±2.19	71.06^{efg}±2.32	57.51^{cd}±6.27
C17	43.88^{g}±5.33	51.16^{efgh}±2.37	49.69^{cd}±3.99
C27	44.92^{g}±14.10	57.56^{efg}±10.20	55.15^{c}±1.95
C37	67.29^{cde}±10.55	54.76^{efg}±4.02	48.76^{cde}±3.71
C47	58.76^{def}±6.60	46.86^{ghi}±2.00	55.87^{c}±5.70
C57	113.82^{a}±13.10	120.20^{a}±15.25	86.91^{a}±7.22
C67	76.96^{c}±3.13	75.57^{cd}±6.69	70.34^{ab}±4.75
YM7	114.02^{a}±8.31	110.37^{ab}±6.14	81.92^{a}±11.67
C19	27.81^{f}±3.65	32.72^{ij}±4.11	29.88^{f}±11.75
C29	40.54^{g}±6.19	44.35^{ghi}±3.68	34.55^{ef}±6.96
C39	42.22^{g}±6.86	48.73^{fgh}±4.29	35.45^{def}±4.80
C49	50.09^{fg}±4.65	62.17^{d}±17.12	47.94^{cde}±16.19
C59	91.34^{b}±11.82	103.10^{b}±7.92	77.69^{a}±7.48
C69	54.49^{efg}±8.20	63.64^{de}±8.16	62.40^{bc}±8.32
YM9	60.14^{def}±2.62	82.37^{c}±12.50	76.62^{a}±14.68

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3), ตัวเลขที่มีกลุ่มอักษร (a b) กำกับต่างกันแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติ ($p \leq 0.05$),ตัวเลขกำกับท้ายสูตรอาหารแสดงถึงจำนวนวันในการเพาะเลี้ยง

ตาราง 15 น้ำหนักเซลล์แห้ง จากการศึกษาสูตรอาหาร และความเป็นกรด-ด่างที่มีผลต่อการผลิตแคโรทีนอยด์ (กรัมต่อลิตร)

สูตรอาหาร	pH4	pH5	pH6
C15	4.06^{bc}±0.33	4.62^{b}±0.52	3.65^{cd}±0.13
C25	4.11^{bc}±0.26	4.65^{b}±2.00	4.15^{c}±0.28
C35	3.5^{c}±0.23	3.62^{cd}±0.36	5.59^{a}±0.20
C45	3.3^{cd}±0.22	3.6^{cd}±0.09	3.34^{d}±0.13
C55	3.64^{c}±0.20	4.2^{bc}±0.20	3.85^{d}±0.22
C65	3.74^{c}±0.15	3.65^{cd}±0.24	3.89^{d}±0.20
YM5	3.34^{cd}±0.23	4.12^{c}±0.23	4.37^{bc}±0.21
C17	4.95^{b}±0.31	4.5^{b}±0.13	4.65^{b}±0.18
C27	6.95^{a}±0.18	5.52^{a}±0.50	4.85^{b}±0.06
C37	3.72^{c}±0.18	4.15^{c}±0.23	4.1^{c}±0.09
C47	3.75^{c}±0.23	4.34^{bc}±0.20	3.64^{d}±0.35
C57	3.34^{cd}±0.28	3.87^{cd}±0.28	3.99^{cd}±0.16
C67	3.64±0.23	4.19^{c}±0.23	4.62^{b}±0.19
YM7	3.3^{cd}±0.31	3.55^{d}±0.28	3.55^{d}±0.36
C19	4.45^{b}±0.23	3.87^{cd}±0.26	4.15^{c}±0.30
C29	4.37^{bc}±0.26	4.12^{c}±0.28	3.9^{cd}±0.23
C39	3.22^{cd}±0.25	2.9^{e}±0.28	3.49^{bc}±0.20
C49	2.95^{d}±0.20	2.57^{ef}±0.20	2.97^{e}±0.25
C59	2.84^{d}±0.22	2.87^{e}±0.10	2.87^{e}±0.18
C69	3.35^{cd}±0.10	3.39^{d}±0.21	3.27^{de}±0.14
YM9	3.12^{d}±0.10	2.75^{e}±0.26	3.15^{de}±0.18

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3), ตัวเลขที่มีกลุ่มอักษร (a b) ในแนวนอนเดียวกันกำกับต่างกันแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติ ($p \leq 0.05$),ตัวเลขกำกับท้ายสูตรอาหารแสดงถึงจำนวนวันในการเพาะเลี้ยง

ตาราง 16 ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด และปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งจากการศึกษาผลของความเร็วรอบในการเขย่าต่อการผลิตแคโรทีนอยด์

ความเร็วรอบ (rpm)	สูตรอาหาร	วันที่ 5		วันที่ 7	
		TCC (μg/g)	CDW (g/L)	TCC (μg/g)	CDW (g/L)
100	C1	29.40^{g}±3.99	4.62^{e}±0.21	51.16^{fg}±2.37	4.50^{ef}±0.03
	C5	54.40^{efg}±0.60	4.42^{ef}±0.10	120.20^{c}±15.24	3.87^{efg}±0.19
	YM	71.06^{e}±2.32	4.12^{ef}±0.22	110.37^{cd}±6.141	3.55^{fg}±0.21
150	C1	68.00^{e}±17.27	4.33^{ef}±0.46	75.25^{e}±4.66	4.97^{ef}±0.38
	C5	137.50^{b}±15.52	5.58^{cd}±0.72	152.66^{a}±20.29	6.06±^{b}20.29
	YM	117.49^{c}±25.20	5.17^{d} ±0.83	124.76^{c}±14.41	6.53^{bc}±0.52
200	C1	59.34^{f}±12.13	4.48^{ef}±0.56	72.91^{e}±3.43	5.42^{d}±0.47
	C5	141.23^{ab}±12.35	6.95^{b}±0.15	147.11^{ab}±8.84	6.97^{b}±0.38
	YM	100.73±^{d}19.41	6.23^{bc}±0.79	110.26^{cd}±16.00	7.93^{a}±0.72

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3), ตัวเลขที่มีกลุ่มอักษร (a b) ในแนวนอนเดียวกันกำกับต่างกันแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติ (p≤0.05)

ตาราง 17 ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด และปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งจากการศึกษาผลของความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อการผลิตแคโรทีนอยด์

NaCl (%)	สูตรอาหาร	วันที่ 5		วันที่ 7	
		TCC (μg/g)	CDW (g/L)	TCC (μg/g)	CDW (g/L)
0	C5	137.49^{a}±15.53	5.58^{a}±0.72	152.66^{a}±20.29	6.07^{ab}±0.52
	YM	117.48^{bc}±25.20	5.11^{ab}±0.83	124.76^{b}±14.41	4.53^{a}±0.47
5	C5	125.62^{b}±14.98	4.01^{bc}±0.29	118.21^{bc}±11.14	5.23^{b}±0.16
	YM	104.78^{c}±17.04	4.37^{b}±0.38	99.25^{c}±3.63	4.88^{b}±0.23
10	C5	125.06^{b}±21.37	3.55^{c}±0.42	112.87^{bc}±5.43	4.60^{bc}±0.25
	YM	101.11^{c}±6.61	3.80^{c}±0.18	98.52^{c}±8.40	4.65^{c}±0.18

หมายเหตุ: ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3), ตัวเลขที่มีกลุ่มอักษร (a b) ในแนวนอนเดียวกันกำกับต่างกันแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติ (p≤0.05)

มหาวิทยาลัยพะเยา
UNIVERSITY OF PHAYAO

บรรณานุกรม

กิตติชัย ตันสิน. (2553). **การเพิ่มผลผลิตและความเสถียรของแคโรทีนอยด์จากยีสต์ฟาเฟียโรโดไซมา.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยศิลปากร

คมกฤต เมฆสกุล และพิมพ์ศิริ สุวรรณพัฒน์. (2556). การศึกษาผลกระทบในการนำระบบมาตรฐาน และการจัดการสิ่งแวดล้อม ISO 14000 ไปประยุกต์ใช้ในโรงงานปลาส้มสันเวียงใหม่ (ปลาส้มศรีทน) จังหวัดพะเยา. **การประชุมวิชาการข่ายงานวิศวกรรมอุตสาหการ ประจำปี 2556** (หน้า.

นฤมล ใบพัด. (2546). **การผลิตแอสตร้าแซนทีนจากสาหร่าย *Haematococcus* sp.** . วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยบูรพา

สิรินดา ยุ่นฉลาด และพิพัฒน์ รวมตะคุ. (2551). **แคโรทีนอยด์ (Carotenoids) รงควัตถุเพื่อสุขภาพพบในผักและผลไม้เท่านั้นหรือ**. วารสารศูนย์บริการวิชาการมหาวิทยาลัยขอนแก่น, 6(4), 13–19.

สุภาพร ภัสสร, นิตยา สุขวรรณา และพนิตนาฏ อู่พุฒินันท์. (2559). **การคัดเลือกยีสต์กลุ่มแคโรทีโนจีนิคจากแหล่งดินธรรมชาติในเขตมหาวิทยาลัยพะเยา**. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา, 21(3), 15–22.

American Public Health, A., Eaton, A. D., American Water Works, A. and Water Environment, F. (2005). **Standard methods for the examination of water and wastewater** (21). Washington, D.C.: APHA–AWWA–WEF.

Andrade, R. F., Lima, R. A., Ribeaux, D. R., Araujo, H., Franco, L. O., Júnior, A, et al. (2016). Production of ²–Carotene by a newly isolated Rhodotorula Glutinis UCP1555 Strain and cytotoxic effect evaluation. **journal of chemistry and chemical engineering**, 10, 212–220.

Bhosale, P. and Gadre, R. V. (2001). β–Carotene production in sugarcane molasses by a *Rhodotorula glutinis* mutant. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 26(6), 327–332. doi:10.1038/sj.jim.7000138. https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000138

Bjørnland, T. (1984). Chlorophyll a and carotenoids of the red alga *Erythrotrichia carnea*. **Biochemical Systematics and Ecology**, 12(3), 279–283. doi:https://doi.org/10.1016/0305–

1978(84)90049-8.
https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0305197884900498

Buzzini, P., Innocenti, M., Turchetti, B., Libkind, D., van Broock, M. and Mulinacci, N. (2007). Carotenoid profiles of yeasts belonging to the genera Rhodotorula, Rhodosporidium, Sporobolomyces, and Sporidiobolus. **Canadian Journal of Microbiology**, 53(8), 1024–1031. doi:10.1139/W07-068. https://doi.org/10.1139/W07-068

Carnecka, M., Halienova, A., Breierová, E. and Kočí, R. (2010). Production of Carotenoid–/Ergosterol–Supplemented Biomass by Red Yeast *Rhodotorula glutinis* Grown Under External Stress. **Food Technology and Biotechnology (imacan@pbf.hr); Vol.48 No.1**, 48.

Chanchay, N., Sirisansaneeyakul, S., Chaiyasut, C. and Poosaran, N. (2012). Optimal Conditions for Carotenoid Production and Antioxidation Characteristics by *Rhodotorula rubra*. **World Academy of Science, Engineering and Technology, Open Science Index 68, International Journal of Biotechnology and Bioengineering**, 6(8), 621–625.

Charles H. Fuchman. (1980). **Peat: Industrial Chemistry and Technology** (130). London: Academic Press.

Cheng, Y.-T. and Yang, C.-F. (2016). Using strain *Rhodotorula mucilaginosa* to produce carotenoids using food wastes. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, 61, 270–275. doi:https://doi.org/10.1016/j.jtice.2015.12.027.

David Ellis. (2019). **Fungal Descriptions and Antifungal Susceptibility**. Date site: 10 October 2019, https://mycology.adelaide.edu.au/descriptions/yeasts/rhodotorula/

Dey, S. and Rathod, V. K. (2013). Ultrasound assisted extraction of β-carotene from *Spirulina platensis*. **Ultrason Sonochem**, 20(1), 271–276. doi:10.1016/j.ultsonch.2012.05.010.

Domíguez-Bocanegra, A. R. and 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(3), 249–252. doi:10.1007/s00253-004-1686-3.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J., Rebers, P. and Smith, F. (1956). Calorimetric Method

for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, 28, 350–356.

Fazeli, M. R., Tofighi, H., Samadi, N. and Jamalifar, H. (2006). Effects of salinity on β-carotene production by *Dunaliella tertiolecta* DCCBC26 isolated from the Urmia salt lake, north of Iran. **Bioresource Technology**, 97(18), 2453–2456. doi:https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.10.037. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852405005171

Fox, H. M. and Vevers, G. (1960). **The nature of animal colours** : London : Sidgwick and Jackson. http://lib.ugent.be/catalog/rug01:000969557

Frengova, G. I. and Beshkova, D. M. (2009). Carotenoids from Rhodotorula and Phaffia: yeasts of biotechnological importance. **J Ind Microbiol Biotechnol**, 36(2), 163–180. doi:10.1007/s10295–008–0492–9.

García–González, M., Moreno, J., Manzano, J. C., Florencio, F. J. and Guerrero, M. G. (2005). Production of *Dunaliella salina* biomass rich in 9–cis–beta–carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor. **J Biotechnol**, 115(1), 81–90. doi:10.1016/j.jbiotec.2004.07.010.

Lau, W., Zarrabal, O., Nolasco–Hipolito, C., Mizuno, K., Gregory, Z. A.–A., Abdullah, M, et al. (2018). Production of pigments by *Rhodotorula mucilaginosa*. 14, 344–350. doi:10.21161/mjm.144188.

Leyton, A., Flores, L., Mäki–Arvela, P., Lienqueo, M. E. and Shene, C. (2019). *Macrocystis pyrifera* source of nutrients for the production of carotenoids by a marine yeast *Rhodotorula mucilaginosa*. **J Appl Microbiol**, 127(4), 1069–1079. doi:10.1111/jam.14362.

Machado, W., Silva, L., Vanzela, E. and Del Bianchi, V. (2019). Evaluation of the process conditions for the production of microbial carotenoids by the recently isolated *Rhodotorula mucilaginosa* URM 7409. **Brazilian Journal of Food Technology**, 22. doi:10.1590/1981–6723.26718.

Mahmoud, Y., Abo–Shady, P. A., El–Sheekh, M. and Hamza, T. (2014). The role of some stress factors including hydrogen peroxide, methylen blue, sodium chloride and ultraviolet on *Rhodotorula glutinis* DBVPG # 4400 total carotenoids production. **International Journal of Biosciences | IJB | ISSN: 2220–6655**, 4, 10–19.

doi:10.12692/ijb/4.9.10-19.

Maldonade, I. R., Rodriguez-Amaya, D. B. and Scamparini, A. R. P. (2012). Statistical optimisation of cell growth and carotenoid production by *Rhodotorula mucilaginosa*. **Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, 43(1), 109-115. doi:10.1590/S1517-838220120001000012. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3768983/

Malisorn, C. and Suntornsuk, W. (2008). Optimization of beta-carotene production by *Rhodotorula glutinis* DM28 in fermented radish brine. **Bioresour Technol**, 99(7), 2281-2287. doi:10.1016/j.biortech.2007.05.019.

Marova, I., Breierová, E., Kočí, R., Friedl, Z., Slovak, B. and Pokorna, J. (2004). Influence of exogenous stress factors on production of carotenoids by some strains of cartenogenic yeasts. **Annals of Microbiology**, 54, 73-85.

Marova, I., Carnecka, M., Halienova, A., Certik, M., Dvorakova, T. and Haronikova, A. (2012). Use of several waste substrates for carotenoid-rich yeast biomass production.**J.EnvironManage**,95Suppl,S338342.doi:10.1016/j.jenvman.2011.06.018 .

Marova, I., Hároniková, A., Petrik, S., Terezie, D. and Breierová, E. (2012). Production of enriched biomass by red yeasts of *Sporobolomyces sp.* Grown on waste substrates. **Journal of microbiology, biotechnology and food sciences**.

Mehta, B. J., Salgado, L. M., Bejarano, E. R. and Cerda-Olmedo, E. (1997). New Mutants of *Phycomyces blakesleeanus* for (beta)-Carotene Production. **Applied and environmental microbiology**, 63(9), 3657-3661. doi:10.1128/AEM.63.9.3657-3661.1997. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1389252/

Misawa, N., Yamano, S. and Ikenaga, H. (1991). Production of beta-carotene in *Zymomonas mobilis* and *Agrobacterium tumefaciens* by introduction of the biosynthesis genes from *Erwinia uredovora*. **Applied and environmental microbiology**, 57(6), 1847-1849. doi:10.1128/AEM.57.6.1847-1849.1991. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1872613.https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC183481/

Naghavi Hanachi และ Parichehr Sabora. (2014). Effect of temperature, PH and salinity on

carotenoid production in *Rodotorula mucilaginosa*. Research in Biotechnology, 5(4): 01–04

Nanou, K., Roukas, T. และ Papadakis, E.–N. (2012). Improved production of carotenes from synthetic medium by *Blakeslea trispora* in a bubble column reactor. **Biochemical Engineering Journal**, 67. doi:10.1016/j.bej.2012.06.018.

Nasirian, N., Mirzaie, M., Cicek, N. and Levin, D. B. (2018). Lipid and carotenoid synthesis by *Rhodosporidium diobovatum,* grown on glucose versus glycerol, and its biodiesel properties. **Can J Microbiol**, 64(4), 277–289. doi:10.1139/cjm–2017–0613.

Nasrabadi, M. R. N. and Razavi, S. H. (2011). Optimization of β–carotene production by a mutant of the lactose–positive yeast *Rhodotorula acheniorum* from whey ultrafiltrate. **Food Science and Biotechnology**, 20(2), 445–454. doi:10.1007/s10068–011–0062–1. https://doi.org/10.1007/s10068–011–0062–1

Patiño–Vera, M., Jiménez, B., Balderas, K., Ortiz, M., Allende, R., Carrillo, A. et al, (2005). Pilot–scale production and liquid formulation of *Rhodotorula minuta*, a potential biocontrol agent of mango anthracnose. **J Appl Microbiol**, 99(3), 540–550. doi:10.1111/j.1365–2672.2005.02646.x.

Perrier, V., Dubreucq, E. and Galzy, P. (1995). Fatty acid and carotenoid composition of Rhodotorula strains. **Archives of Microbiology**, 164(3), 173–179. doi:10.1007/BF02529968. https://doi.org/10.1007/BF02529968

Petrik, S., Marova, I., Hároniková, A., Kostovova, I. and Breierová, E. (2013). Production of biomass, carotenoid and other lipid metabolites by several red yeast strains cultivated on waste glycerol from biofuel production – A comparative screening study. **Annals of Microbiology**, 63. doi:10.1007/s13213–013–0617–x.

Rabbani, S., Beyer, P., Lintig, J., Hugueney, P. and Kleinig, H. (1998). Induced beta–carotene synthesis driven by triacylglycerol deposition in the unicellular alga *Dunaliella bardawil*. **Plant physiology**, 116(4), 1239–1248. doi:10.1104/pp.116.4.1239. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC35030/

Razani, S. H., Mousavi, S. M., Yeganeh, H. M. and Marc, I. (2007). Fatty acid and carotenoid production by *Sporobolomyces ruberrimus* when using technical glycerol and ammonium sulfate. **J Microbiol Biotechnol**, 17(10), 1591–1597.

Rizzello, F., De Paolis, A., Durante, M., Blando, F., Mita, G. and Caretto, S. (2014). Enhanced production of bioactive isoprenoid compounds from cell suspension cultures of *Artemisia annua* L. using β–cyclodextrins. **Int J Mol Sci**, 15(10), 19092–19105. doi:10.3390/ijms151019092.

Saenge, C., Cheirsilp, B., Suksaroge, T. T. and Bourtoom, T. (2011). Efficient concomitant production of lipids and carotenoids by oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* cultured in palm oil mill effluent and application of lipids for biodiesel production. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, 16(1), 23–33. doi:10.1007/s12257–010–0083–2. https://doi.org/10.1007/s12257–010–0083–2

Simpson, K. L., Nakayama, T. O. and Chichester, C. O. (1964). BIOSYNTHESIS OF YEAST CAROTENOIDS. **Journal of bacteriology**, 88(6), 1688–1694. doi:10.1128/JB.88.6.1688–1694.1964. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC277474/

Somashekar, D. and Joseph, R. (2000). Inverse relationship between carotenoid and lipid formation in *Rhodotorula gracilis* according to the C/N ratio of the growth medium. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 16(5), 491–493. doi:10.1023/A:1008917612616. https://doi.org/10.1023/A:1008917612616

Takaichi, S., Mochimaru, M., Uchida, H., Murakami, A., Hirose, E., Maoka, T., et al. (2012). Opposite Chilarity of α–Carotene in Unusual Cyanobacteria with Unique Chlorophylls, Acaryochloris and Prochlorococcus. **Plant and Cell Physiology**, 53(11), 1881–1888. doi:10.1093/pcp/pcs126.

Tang, W., Wang, Y., Zhang, J., Cai, Y. and He, Z. (2019). Biosynthetic Pathway of Carotenoids in Rhodotorula and Strategies for Enhanced Their Production. **J Microbiol Biotechnol**, 29(4), 507–517. doi:10.4014/jmb.1801.01022.

Taskin, M. and Erdal, S. (2011). Production of carotenoids by *Rhodotorula glutinis* MT–5 in submerged fermentation using the extract from waste loquat kernels as substrate. **J Sci Food Agric**, 91(8), 1440–1445. doi:10.1002/jsfa.4329.

Tinoi, J., Rakariyatham, N. and Deming, R. L. (2005). Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolyzed mung bean waste Xour as substrate. **Process Biochemistry**, 40, 2551–2557. doi:10.1016/j.procbio.2004.11.005.

Trevor Walworth Goodwin. (1980). **The Biochemistry of the carotenoids** (2 ed. พิมพ์ครั้งที่

1). New york: Chapman & Hall.

Valduga, E., Rausch Ribeiro, A. H., Cence, K., Colet, R., Tiggemann, L., Zeni, J., et al, (2014). Carotenoids production from a newly isolated *Sporidiobolus pararoseus* strain using agroindustrial substrates. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 3(2), 207–213. doi:https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.10.001. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S187881811300114X

Wang, B., Lin, L., Lu, L. and Chen, W. (2012). Optimization of β–carotene production by a newly isolated Serratia marcescens strain. **Electronic Journal of Biotechnology**, 15. http://www.ejbiotechnology.info

Zhao, J., Li, Q., Sun, T., Zhu, X., Xu, H., Tang, J., et al, (2013). Engineering central metabolic modules of Escherichia coli for improving β–carotene production. **Metab Eng**, 17, 42–50. doi:10.1016/j.ymben.2013.02.002.

Zumriye Aksu and A Tugba Eren. (2005). Carotenoids production by the yeast Rhodotorula mucilaginosa: Use of agricultural wastes as a carbon source. **Process Biochemistry**, 40, 2985–2991.

Chan, L. C., Greenfield, P. F. and Reid, S. (1998). Optimising fed–batch production of recombinant proteins using the baculovirus expression vector system. **Biotechnol Bioeng**, 59(2), 178–188. doi:10.1002/(sici)1097–0290(19980720)59:2<178::aid–bit6>3.0.co;2–e.

Dhaliwal MK and Chandra. (2015). Optimization of Carotenoids Production by *Rhodotorula mucilaginosa*. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, 6(3), 1161–1165. doi:doi: 10.13040/IJPSR.0975–8232

Elsanhoty, R., Al–Turki, A. I. and M.M, A.–R. (2017). **Production of carotenoids from *Rhodotorula mucilaginosa*** and their applications as colorant agent in sweet candy. 15, 21–26.

Guo, Y., Xie, S., Yuan, J. S. and Kao, K. C. (2019). Effects of Seawater on Carotenoid Production and Lipid Content of Engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Fermentation**, 5(1). doi:10.3390/fermentation5010006.

Liu, Y.–S. and Wu, J. (2007). Optimization of cell growth and carotenoid production of

Xanthophyllomyces dendrorhous through statistical experiment design. **Biochemical Engineering Journal**, 36, 182–189. doi:10.1016/j.bej.2007.02.014.

Maldonade, I. R., Scamparini, A. R. P. and Rodriguez-Amaya, D. B. (2007). Selection and characterization of carotenoid-producing yeasts from Campinas region, Brazil. **Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, 38(1), 65–70. doi:https://doi.org/10.1590/S1517-83822007000100014.

Meyer, P. S. and Du Preez, J. C. (1994). Effect of culture conditions on astaxanthin production by a mutant of *Phaffia rhodozyma* in batch and chemostat culture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 40(6), 780–785. doi:10.1007/BF00173974. https://doi.org/10.1007/BF00173974

Naghavi FarzanehSadat, Hanachi Parichehr and Saboora Azra. (2014). Effect of Temperature, pH and Salinity on carotenoid production in *Rodotorula mucilaginosa*. **Research in Biotechnology**, 5(4).

Omar, S. and Selim, M. (2020). Agro-industrial Orange Waste as a Low Cost Substrate for Carotenoids Production by *Rhodotorula mucilagenosa*. 50, 62–74. doi:10.21608/ajas.2019.33459.

Peña, A., Sánchez, N. S., Álvarez, H., Calahorra, M. and Ramírez, J. (2015). Effects of high medium pH on growth, metabolism and transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS yeast research**, 15(2). doi:10.1093/femsyr/fou005. https://doi.org/10.1093/femsyr/fou005

Qiang, W., Liu, D., Yang, Q. and Wang, P. (2017). Enhancing carotenoid production in *Rhodotorula mucilaginosa* KC8 by combining mutation and metabolic engineering. **Annals of Microbiology**, 67, 1–7. doi:10.1007/s13213-017-1274-2.

Sharma, R. and Ghoshal, G. (2019). Optimization of carotenoids production by *Rhodotorula mucilaginosa* (MTCC-1403) using agro-industrial waste in bioreactor: A statistical approach. **Biotechnology reports (Amsterdam, Netherlands)**, 25, e00407–e00407.doi:10.1016/j.btre.2019.e00407. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31886140

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6921150/

มหาวิทยาลัยพะเยา
UNIVERSITY OF PHAYAO

มหาวิทยาลัยพะเยา
UNIVERSITY OF PHAYAO

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	นางสาว อรวรรณ ยะมนต์
วัน เดือน ปี เกิด	11 มิถุนายน 2539
สถานที่เกิด	สุโขทัย
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2561 วท.บ (จุลชีววิทยา) มหาวิทยาลัยพะเยา, พะเยา
ที่อยู่ปัจจุบัน	196 ม.5 ต.แม่สิน อ.ศรีสัชนาลัย จ.สุโขทัย 64130
ผลงานตีพิมพ์	อรวรรณ ยะมนต์ และ สุภาพร ภัสสร (2020)การใช้น้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมผลิตปลาส้มเพื่อการผลิตแคโรทีนอยด์ โดยยีสต์ Rhodotorula mucilaginosa UP12.วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มรย. 6(1), 53-61
รางวัลที่ได้รับ	รางวัลนิสิตเกียรติยศ ด้ายกิจกรรมเสริมหลักสูตร กิจกรรมบำเพ็ญประโยชน์และรักษาสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยพะเยา ประจำปี 2561 รางวัลนิสิตเกียรติยศ ด้ายกิจกรรมเสริมหลักสูตร กิจกรรมบำเพ็ญประโยชน์และรักษาสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยพะเยา ประจำปี 2562